

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS POR
HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA E SUA
RELAÇÃO COM A PATOGÊNESE EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

YUKIE SATO KUWABARA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Sato-Kuwabara, Yukie

Análise de alterações cromossômicas por hibridação genômica comparativa e sua relação com a patogênese em carcinoma epidermóide de esôfago / Yukie Sato Kuwabara - São Paulo, 2010.

148p.

Tese (doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DO ESÔFAGO. 2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 3. ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS. 4. TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR. 5. HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA.

DEDICATÓRIA

À minha sogra, Izaura Hiroko Kuwabara (*in
memorian*), pelo exemplo de luta, determinação e
fé inabalável...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, a quem admiro por sua competência, dedicação, profissionalismo e respeito pela pesquisa científica. Agradeço pela oportunidade e por sua orientação, confiança, apoio e paciência ao longo desses sete anos de aprendizado e por oferecer todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Sílvia Regina Rogatto, pela sua contribuição imprescindível a esse trabalho. Pela sua paciência, apoio, amizade, ensinamentos e confiança ao abrir as portas de seu laboratório, onde pude desenvolver esse trabalho.

Ao meu marido, Eduardo Fumio Kuwabara, pela compreensão e paciência nos meus momentos de desânimo, angústia e crises de mau humor, mas especialmente, pelo seu amor e amizade incondicionais, sem os quais tudo se tornaria muito mais difícil.

Aos meus pais, Eiko Sato e Minoru Sato (*in memoriam*), por ser um exemplo de luta e determinação. Agradeço por sempre acreditarem em mim e pelo incentivo e apoio incondicional durante todo este período.

À minha irmã Akemi, minha tia Sueka e ao meu sobrinho Mauro, pelo apoio e simplesmente por existirem em minha vida.

Aos meus sogros, Izaura (*in memoriam*) e Jorge Kuwabara, por me deixarem fazer parte de sua família e por todo o apoio e amizade.

Aos queridos amigos, Maria José, Renata, Tais, Ricardo, Viviane, Marcelo, Lívia, Cristiane, Jun, Karina, Clarice, Claudio, Simone e Mayumi, pelos momentos de descontração, apoio, desabafos e incentivo nessa minha

jornada e, principalmente, pela amizade sincera cultivada durante todos esses anos.

Aos amigos, Edaise (Pex), Luciane (Nescau), Alice, Ligia, Fernanda, Juliano (Kissi), Kátia, Gilmara, Alexandra, Liliane e Mila, pelo companheirismo, apoio, risos, desabafos e os “lanchinhos de fim de tarde”, que tornaram todos esses dias menos árduos e mais prazerosos.

À todos do laboratório Neogene, Ariane, Luciana, Fernanda, Hellen, Fabíola, André, Francine, Lívia, Deborah, Mateus, Juan, Graziela e Rogério, que contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento desse trabalho; especialmente, à Cássia, Sara, Priscila e Fábio, por todo o auxílio durante os experimentos e análises de CGH e pela amizade cultivada durante este período.

Às colegas de laboratório, Marcilei, Claudia, Adriana, Renatinha, Mérin, Maria José e Gwen, pela convivência, risadas, “festas da coxinha” e pelo auxílio durante o andamento do projeto.

Ao Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos e André Abreu Silva, pelas amostras cedidas pelo Banco de Tumores.

Ao Dr. Clóvis Klock, por contribuir cedendo as amostras procedentes do Hospital Santa Teresinha, de Erechim (RS).

Aos colegas Severino da Silva Ferreira e Carlos Ferreira Nascimento, pela competência e excelência na preparação do material utilizado.

Ao Rodrigo Crespo, Marina Gomes, Eloisa Olivieri, Louise Mota e Vera Prescinoti, pela ajuda com a extração de DNA das amostras utilizadas neste estudo.

Aos membros da Banca de Qualificação Dr. André Lopes de Carvalho e Dra. Marilene Hohmuth Lopes, pelas críticas e sugestões que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. José Humberto Fregnani, pela paciência e presteza nas análises estatísticas realizadas nesse trabalho.

Ao Dr. Felipe Coimbra, do Departamento de Cirurgia Abdominal, pela auxílio durante o levantamento dos dados clínicos dos casos envolvidos nesse estudo.

Aos colegas de pós-graduação, Mariana (Milka), Nair, Carol e Amanda, pelo companheirismo, incentivo e auxílio durante este período.

Às funcionárias da Pós-Graduação Ana Maria Alves Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Rodrigues, pela paciência, atenção e auxílio oferecidos durante o desenvolvimento desse estudo.

À toda equipe da Biblioteca, pela presteza durante as pesquisas bibliográficas e pela formatação desse trabalho.

À todos do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer, pelo auxílio e presteza durante o levantamento dos dados nos prontuários médicos.

À todos do Departamento de Anatomia Patológica, funcionários e residentes, que de alguma forma, colaboraram para a conclusão desse estudo.

À CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro, indispensável para o desenvolvimento desse estudo.

RESUMO

Sato-Kuwabara Y. **Análise de alterações cromossômicas por hibridação genômica comparativa e sua relação com a patogênese em carcinoma epidermóide de esôfago**. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) é o tipo histológico mais comum de câncer do órgão e, geralmente, está associado a um prognóstico ruim, por se tratar de um tumor em estadio avançado ao diagnóstico. Assim, é importante identificar marcadores moleculares que possam auxiliar na escolha de melhor tratamento, além de aprimorar os métodos de diagnóstico. O objetivo desse estudo foi identificar as alterações genômicas em CEE, usando a técnica de hibridação genômica comparativa e verificar a relação desses achados com variáveis clínico-patológicas.

Métodos: Foram avaliadas 30 amostras de CEE, sendo que 21 casos FFEP foram submetidos à técnica de hibridação genômica comparativa de alta resolução (HR-CGH) e 18 amostras congeladas foram analisadas por CGH *array* (aCGH). Nove casos pareados (amostras em FFEP e congeladas) foram avaliadas por ambas as metodologias. Para a técnica de aCGH, foi utilizada a plataforma *Human Genome High-Definition CGH Microarray 4x44K* (Agilent), seguindo as recomendações do fabricante. **Resultados:** A análise de HR-CGH revelou 155 alterações cromossômicas em regiões mínimas comuns, das quais 111 estavam envolvidas em perdas e 44, em ganhos genômicos. Dentre tais alterações, as perdas mais frequentes envolveram as regiões 1q, 2p, 3p, 4p, 5q, 7p, 7q, 8q, 9p, 11q, 12q, 13q, 16p, 16q, 18p, 18q, 19p, 20p e 22q. Foram detectados ganhos genômicos mais frequentemente em 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 4q, 6q, 7q, 10q, 11p e 11q. Entre tais alterações, ganhos em 1q12-q13 e perdas em 3p24, 3p25 e em 13q31 mostraram associação significativa com comprometimento linfonodal. Ganhos em 1q22-q23 e em 6q21 e perdas em 19q13.1 e 19q13.2 foram

mais freqüentes em casos apresentado grau histológico mais elevado. Perdas em 12q24.3 foram mais freqüentes em casos com ausência de invasão linfática. Perdas em 3p25 e em 15q25-q26 mostraram associação significativa com estadios mais precoces. Foram detectadas 38 alterações genômicas em regiões mínimas comuns por aCGH, dos quais 21 estavam envolvidas em ganhos e 17, em perdas genômicas. Ganhos genômicos foram detectados em 3q, 8q e 11q. Já as perdas genômicas foram encontradas em 3q, 5q, 8q, 9p, 14q, 18q, 19p e 21q. Foi possível observar que casos com infiltração até adventícia, presença de comprometimento linfonodal e estadios mais avançados apresentaram um perfil de alterações genômicas mais instável. No entanto, apenas os ganhos em 11q13.2 mostrou associação significativa com invasão linfática. A comparação entre os achados de aCGH e HR-CGH permitiu identificar alterações concordantes às duas metodologias, como os ganhos em 11q13.2-q13.3 e perdas em 5q35.2, 9p23-p21.3, 9p21.3, 9p21.3-p21.1, 9p13.3-p13.1, 14q32.12 e em 19q13.11. Considerando as regiões alteradas detectadas por aCGH, aproximadamente 730 genes encontram-se mapeados nestas regiões e estão relacionados ao controle do ciclo celular, crescimento e adesão celular, transcrição gênica, entre outros. **Conclusões:** Foi possível observar que casos tumorais com comportamento mais invasivo apresentaram perfil de alterações genômicas mais instável. A análise de alterações genômicas por ambas as metodologias mostrou a existência de associações entre tais alterações e variáveis clínico-patológicas, sugerindo que genes mapeados em tais regiões podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral em CEE. Além disso, a comparação entre os dados obtidos por HR-CGH e aCGH permitiu avaliar diferenças entre as duas metodologias.

SUMMARY

Sato-Kuwabara Y. [**Analysis of genomic alterations using comparative genomic hybridization and the association with esophageal squamous cell carcinoma pathogenesis**]. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is the most common histological type of cancer in this organ. ESCC is associated with poor prognosis, because it is usually at advanced stage disease at the moment of diagnosis. Therefore, it is important to identify the molecular markers that determine the most appropriate surgical approach in order to select patients for target-directed therapies and improve the diagnostic methods. The aim of this study was to identify the genomic alterations in ESCC using the comparative genomic hybridization method and to verify the association between these findings and clinicopathological features.

Methods: Thirty ESCC samples were evaluated in this study. Twenty-one FFPE samples were submitted to High Resolution-Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH). Array-CGH was carried out in 18 frozen tissue samples using the Agilent Human Genome CGH Microarray 44K Kit following the manufacturer's protocol. **Results:** The HR-CGH analysis revealed 155 chromosomal alterations in minimal common regions, including 111 losses and 44 genomic gains. The most recurrent losses were detected at 1q, 2p, 4p, 5q, 7p, 7q, 8q, 9p, 11q, 12q, 13q, 16p, 16q, 18p, 18q, 19p, 20p e 22q. Frequent gains occurred at 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 4q, 6q, 7q, 10q, 11p e 11q. Among these alterations gains at 1q12-q13 and losses at 3p24, 3p25 and 13q31 were significantly associated with lymph node metastasis. Gains at 1q22-q23 and 6q21 and losses at 19q13.1 and 19q13.2 were more frequent in more differentiated tumor samples. Losses at 12q24.3 were more frequent in cases with absence of lymphatic invasion. Losses at 3p25 and 15q25-26 showed significant association with earlier stages. The aCGH analysis

revealed 38 genomic alterations including 21 regions involved in genomic gains and 17 in losses. Genomic gains were detected at 3q, 8q and 11q; losses were found at 3q, 5q, 8q, 9p, 14q, 19p and 21q. A more unstable genomic alterations profile were found among the cases showing deeper tumor infiltration level, lymph node metastasis and advanced stages. However only gains at 11q13.2 showed significant association with lymphatic invasion. The comparison between the HR-CGH and aCGH findings revealed recurrent alterations in both analysis as gains at 11q13.2-q13.3 and losses at 5q35.2, 9p23-p21.3, 9p21.3, 9p21.3-p21.1, 9p13.3-p13.1, 14q32.12 and 19q13.11. According to the aCGH analysis, approximately 730 genes were mapped to the altered regions. Many of these genes are related to various cellular processes as cell cycle control, cell growth and adhesion, gene transcription and others. **Conclusion:** Tumors showing a more invasive behaviour presented a more unstable genomic alteration profile. HR-CGH and aCGH analysis showed significant associations between some genomic alterations and clinicopathological findings, suggesting that genes mapped to these regions have a role in tumor development and progress in ESCC. Additionally, the comparison between the HR-CGH and aCGH findings revealed differences between the two techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão de hibridação de HR-CGH da amostra ESOP15	44
Figura 2	Perfil representativo das regiões mínimas alteradas identificadas por HR-CGH ($p < 0,05$) comuns entre as 21 amostras de CEE	45
Figura 3	Exemplo do padrão de hibridação do cromossomo 1 no caso de CEE ESOP2, avaliado por aCGH	51
Figura 4	Ideograma representativo do perfil de alterações genômicas identificadas por aCGH nos casos ESOP1, ESOP4, ESOP9 e ESOP39	55
Figura 5	Ideograma representativo das alterações envolvendo grandes segmentos cromossômicos, identificados por aCGH nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 18, e 21 em 18 casos de CEE	56
Figura 6	Perfil das alterações genômicas dos 18 casos de CEE avaliados por aCGH	60
Figura 7	Perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH, em casos de CEE de acordo com o grau de diferenciação tumoral	64
Figura 8	Perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH em casos de CEE, baseado no nível de infiltração tumoral	65
Figura 9	Perfil de alterações genômicas identificadas por aCGH em casos de CEE, de acordo com invasão venosa	66

Figura 10	Perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH, em casos de CEE de acordo com a presença de metástase linfonodal	67
Figura 11	Perfil de alterações genômicas identificados por aCGH, em casos de CEE, de acordo com o estadiamento tumoral	68
Figura 12	Perfil de alterações genômicas, detectadas por aCGH, em casos de CEE de acordo com evolução da doença	69
Figura 13	Perfil de alterações genômicas identificadas por aCGH de casos de CEE, de acordo com invasão linfática	70
Figura 14	Representação dos genes que encontram-se mapeados nas regiões envolvidas em ganhos genômicos 11q13.2-q13.3, detectadas por aCGH em CEE	81
Figura 15	Representação do ganho genômico envolvendo o gene <i>CCND1</i> , mapeado na região 11q13.2 em de CEE, detectado por aCGH	82
Figura 16	Representação do ganho genômico envolvendo os genes <i>FGF19</i> , <i>FGF4</i> e <i>FGF3</i> , mapeado na região 11q13.3 detectado por aCGH em casos de CEE	83
Figura 17	Representação do ganho genômico envolvendo o gene <i>CTTN</i> , mapeado na região 11q13.3 detectado por aCGH em casos de CEE	84
Figura 18	Representação de perda genômica envolvendo o gene <i>CDH2</i> , mapeado na região 18q12.1 detectado por aCGH em casos de CEE	85

Figura 19	Representação de perda genômica envolvendo os genes <i>CDH7</i> e <i>CDH19</i> , mapeado na região 18q22.1 detectado por aCGH em casos de CEE	86
Figura 20	Representação de perda genômica envolvendo o gene <i>CDH20</i> , mapeado na região 18q21.33 detectado por aCGH em casos de CEE	87
Figura 21	Representação de perda genômica envolvendo os genes <i>DSG1</i> , <i>DSG2</i> , <i>DSG3</i> e <i>DSG4</i> , mapeado na região 18q12.1 detectado por aCGH em casos de CEE	88
Figura 22	Representação de perda genômica envolvendo os genes <i>DSC1</i> , <i>DSC2</i> e <i>DSC3</i> , mapeado na região 18q12.1 detectado por aCGH em casos de CEE	89
Figura 23	Representação do ganho genômico envolvendo o gene <i>DVL3</i> , mapeado na região 3q27.1 detectado por aCGH em casos de CEE	90
Figura 24	Representação esquemática de ganho genômico envolvendo o gene <i>LRP5</i> , mapeado em 11q13.2.	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sumário dos dados resultantes da análise de alterações no número de cópias de seqüências de DNA por CGH cromossômico em casos de CEE descritos em literatura	12
Quadro 2	Sumário dos dados resultantes de análise de alterações genômicas por CGH <i>array</i> em casos de CEE descritos em literatura.	18
Quadro 3	Relação dos 30 casos de CEE envolvidos no presente estudo	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sumário dos dados clínico-patológicos dos 30 casos de CEE levantados para esse estudo	41
Tabela 2	Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as 21 amostras de CEE avaliadas	46
Tabela 3	Associação entre alterações genômicas identificadas por HR-CGH e variáveis clínico-patológicas.	48
Tabela 4	Resumo das alterações genômicas identificadas por CGH <i>array</i> em cada caso avaliado	52
Tabela 5	Sumários dos dados resultantes da comparação entre o perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH em casos de CEE, de acordo com variáveis clínico-patológicas	63
Tabela 6	Associação entre alterações genômicas identificadas por aCGH e fatores clínico-patológicos em CEE	71
Tabela 7	Regiões cromossômicas alteradas em cada caso de CEE, detectadas por aCGH utilizando o <i>threshold</i> de 6.0, que foram concordantes com os dados obtidos por HR-CGH	75
Tabela 8	Alterações em regiões mínimas comuns, detectadas por aCGH (<i>threshold</i> 6.0) nos nove casos pareados que foram submetidos as duas metodologias: HR-CGH e aCGH	76
Tabela 9	Regiões cromossômicas alteradas em cada caso de CEE, detectadas por aCGH utilizando o <i>threshold</i> de 5.0, que foram concordantes com os dados obtidos por HR-CGH	77

Tabela 10 Alterações em regiões mínimas comuns, detectadas por aCGH (*threshold* 5.0) nos nove casos pareados que foram submetidos as duas metodologias: HR-CGH e aCGH 79

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE	Carcinoma Epidermóide de Esôfago
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
aCGH	<i>Array CGH</i>
HR-CGH	<i>High Resolution-Comparative Genomic Hybridization</i>
FFEP	Fixada em formalina e em blocos de parafina
SCOMP	<i>Single Cell Comparative Genomic Hybridization</i>
ULS	<i>Universal Labeling System</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variantes</i>
TNM	Tumor Nódulo Metástase
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
LRP5/6	<i>Low-density-lipoprotein receptor related protein</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
DVL	<i>Dishvelled</i>
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i>
CTTN	<i>Cortactin</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDH	<i>Cadherin</i>
DSC	<i>Desmocolin</i>
DSG	<i>Desmoglein</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Carcinoma Epidermóide de Esôfago	2
1.2	Hibridação genômica comparativa (CGH) e câncer	6
1.2.1	CGH cromossômico e CEE.....	8
1.2.2	CGH <i>array</i> e CEE.....	14
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivos específicos	19
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Amostras de CEE.....	21
3.2	Extração de DNA genômico.....	22
3.2.1	Amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFEP).....	22
3.2.1.1	Microdissecção à laser – LCM (do inglês, <i>Laser Capture Microdissection</i>).....	23
3.2.1.2	Microdissecção manual (<i>Scrape</i>).....	24
3.2.2	Amostras Congeladas.....	26
3.3	Hibridação genômica comparativa.....	27
3.3.1	CGH de alta resolução (HR-CGH).....	27
3.3.1.1	Primeira amplificação por SCOMP (do inglês, <i>Single Cell Comparative Genomic Hybridization</i>).....	28
3.3.1.2	Hibridação e lavagens	30
3.3.1.3	Análise de HR-CGH.....	32
3.3.2	CGH <i>array</i> (aCGH).....	33
3.3.2.1	Fragmentação e marcação do DNA genômico	34
3.3.2.2	Hibridação e lavagem	35
3.3.2.3	Análise dos dados – aCGH	36
3.4	Análise estatística	37

4	RESULTADOS	
4.1	Casuística.....	39
4.2	HR-CGH.....	42
4.2.1	Associação entre alterações genômicas identificadas por HR-CGH e dados clínico-patológicos.....	47
4.3	CGH <i>array</i>	49
4.3.1	Regiões mínimas comuns alteradas em CEE identificadas por CGH <i>array</i>	58
4.3.2	Comparação entre os perfis de alterações genômicas detectadas por CGH <i>array</i> , de acordo com variáveis clínico-patológicas.....	61
4.3.3	Comparação entre os achados de CGH <i>array</i> e HR-CGH.....	72
4.3.4	Genes de interesse.....	80
5	DISCUSSÃO	
5.1	HR-CGH.....	93
5.2	CGH <i>array</i>	105
5.3	CGH <i>array</i> x HR-CGH.....	111
5.4	Genes de interesse.....	114
6	CONCLUSÃO	127
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

ANEXOS

Anexo 1 Relação dos dados clínico-patológicos dos 30 casos de CEE avaliados nesse estudo.

Anexo 2 Regiões envolvidas em ganhos e perdas genômicas em cada um dos 21 casos de CEE avaliados, detectados por HR-CGH.

Anexo 3 Alterações genômicas em regiões mínimas comuns, detectadas por CGH *array* em 18 casos de CEE, e respectivos genes mapeados em tais regiões.

Anexo 4 Alterações genômicas detectadas por HR-CGH em 18 casos

de CEE, que são consistentes com dados da literatura.

Anexo 5 Alterações genômicas detectadas por aCGH em 18 casos de CEE, que são consistentes com dados da literatura.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO (CEE)

Segundo os dados do *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (FERLAY et al. 2008), o câncer de esôfago é o oitavo tipo de neoplasia mais comum, com estimativa de cerca de 481 mil casos novos, correspondendo a 3,8% do total de casos de câncer no mundo todo. É a sexta causa de morte por câncer, com estimativa de 406 mil mortes/ano, o que equivale a 5,4% do total de mortes por câncer no mundo inteiro (FERLAY et al. 2008).

No âmbito mundial, existe uma grande variabilidade regional nas taxas de incidência e mortalidade em câncer de esôfago, sendo as mais altas encontradas em países do sul e leste da África e leste da Ásia, como Iran, Madagascar, Moçambique, China e Japão. Na América Latina, países como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai apresentam as maiores taxas de incidência para essa doença (FERLAY et al. 2008).

O câncer de esôfago ocorre predominantemente em países em desenvolvimento, sendo a sexta neoplasia em frequência em nosso país, com estimativa de cerca de 10600 casos novos/ano e causando mais do que 5300 óbitos por ano. Ocorre predominantemente em homens, em uma taxa de incidência bruta de 8,12:100000 em homens e de 2,69:100000 em mulheres em todo o país (Ministério da Saúde 2008). Os dados do Instituto

Nacional do Câncer mostram uma grande diferença regional em nosso país, sendo que as taxas brutas de incidência, em homens por região geográfica do país são muito diferenciadas, sendo na região Norte de 1,98:100000, no Nordeste de 3,89:100000, no Centro-Oeste de 6,26:100000, no Sudeste de 9,74:100000 e na região Sul de 15,82:100000. O Rio Grande do Sul é o estado de maior incidência da doença, com taxa bruta de 18,50:100000 para homens e 7,18:100000 para mulheres (Ministério da Saúde 2008).

Essa diferença regional observada entre as taxas de incidência de câncer de esôfago sugere o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia, como dieta e alto consumo de tabaco e álcool (DIETZ et al. 1998; ENGEL et al. 2003; RIBEIRO PINTO et al. 2003). Regiões que apresentam alta incidência dessa doença, como a Argentina, Uruguai e o estado do Rio Grande do Sul, apresentam o hábito de consumir o mate quente, bebida feita da infusão de folhas secas de *Ilex paraguayensis* (DIETZ et al. 1998). Alguns estudos têm verificado a associação entre o consumo de mate e regiões de alta incidência de CEE, levando a hipótese de que o mate pode ser considerado um fator etiológico associado ao desenvolvimento deste tumor (CASTELLSAGUE et al. 2000; DE STEFANI et al. 2003; SEWRAM et al. 2003). No entanto, ainda não existe um consenso em relação ao possível mecanismo pelo qual o mate possa ser considerado carcinogênico para o CEE.

O câncer de esôfago apresenta dois tipos histológicos principais, carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma, sendo o carcinoma

epidermóide (CEE) o tipo histológico mais comum (ROSAI 2004; LAMBERT e HAINAUT 2007).

O modelo de progressão carcinogênica segue o observado em outras mucosas revestidas por epitélio pluriestratificado, apresentando lesões displásicas, neoplasia intraepitelial e carcinoma invasor. De modo geral, a displasia epitelial tem sido definida como um crescimento desordenado do epitélio, caracterizada por atipia celular, diferenciação anormal e arquitetura desorganizada, sendo essas características mais acentuadas em displasias mais graves (ou de alto grau), e equivalente ao carcinoma *in situ* ou intraepitelial (KUWANO et al. 2003).

Acredita-se que a inflamação crônica do tecido que reveste o trato esofágico, causadas por toxinas provenientes do cigarro e álcool, pode ser um fator desencadeador do desenvolvimento tumoral em CEE (BIRD-LIEBERMAN e FITZGERALD 2009).

De modo geral, a fase mais precoce de CEE é assintomática, o que faz com que o diagnóstico desse tumor ocorra em estágios mais avançados. Um dos principais sintomas dessa doença é a disfagia, ou seja, a dificuldade para deglutição, que ocorre quando há considerável invasão do lúmen esofágico pelo tecido tumoral. Outro sintoma comum nesse tipo tumoral é a dor, geralmente, desencadeada quando há invasão em órgãos adjacentes ao esôfago (BIRD-LIEBERMAN e FITZGERALD 2009). Por esse motivo, na grande maioria dos casos, o CEE está associado a um prognóstico ruim, por se tratar de um tumor em estadio avançado ao diagnóstico.

O comprometimento linfonodal é freqüentemente observado, por apresentar uma rica drenagem linfática no tecido esofagiano, e este fator tem sido considerado como uma importante causa para o fracasso das terapias em CEE (KUWANO et al. 2003; ROSAI 2004).

Embora as várias modalidades de terapia, adicionalmente à ressecção cirúrgica, tenham sofrido melhora ao longo dos anos, ainda observa-se uma alta taxa de mortalidade após cirurgia (FUJITA et al. 1995; NAKAGAWA et al. 2004; TACHIBANA et al. 2005). Em casos de CEE localmente avançados, a ressecção cirúrgica continua sendo a principal opção de tratamento com potencial intenção curativa. A utilização de terapias adjuvantes e neoadjuvantes como quimioterapia e radioterapia é relatada em casos de CEE, na tentativa de aumentar as taxas de cura e diminuir o risco de recorrência da doença. No entanto, a eficácia de tais procedimentos terapêuticos ainda não está bem definida (LIU et al. 2008).

Os avanços na compreensão das características moleculares dos tumores permitiram o desenvolvimento de terapias-alvo moleculares, e conseqüentemente, de tratamentos mais efetivos e com menor toxicidade que poderiam ser aplicados em casos de CEE (KU e ILSOON 2009). Desse modo, é importante identificar marcadores moleculares que possam definir subgrupos de pacientes com melhor ou pior prognóstico, auxiliar na escolha de melhor tratamento, além de aprimorar os métodos de diagnóstico, e assim, melhorar a sobrevida desses pacientes. Análises envolvendo diferentes marcadores em amostras de CEE foram realizados por nosso grupo. Casos com amplificação gênica de HER2 (human epidermal growth

factor receptor 2) mostraram pior prognóstico, quando comparados aos casos com ausência de amplificação desse gene, indicando que casos apresentando amplificação de HER2 poderiam se beneficiar do tratamento com Trastuzumab, uma vez que amplificação desse gene indica um grupo de pacientes em que esse tipo de tratamento poderia melhorar o prognóstico (SATO-KUWABARA et al. 2009).

1.2 HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH) E CÂNCER

Métodos em citogenética têm sido muito utilizados em diagnóstico clínico e pesquisa básica e contribuído para desvendar rearranjos estruturais e marcadores moleculares em diversos tumores humanos (SPEICHER e CARTER 2005). Inicialmente, os estudos envolviam técnicas convencionais baseadas em análise de cariótipo e bandamento cromossômico, capazes de detectar alterações cromossômicas numéricas e estruturais (LI e PINKEL 2006).

O advento da técnica de Hibridação Genômica Comparativa (CGH, do inglês *Comparative Genomic Hybridization*) permite detectar aberrações cromossômicas de todo o genoma em apenas um experimento, como amplificação e deleção, sem a necessidade de prévio conhecimento do cariótipo (SPEICHER e CARTER 2005).

Resumidamente, a técnica de CGH cromossômico baseia-se na hibridação *in situ* fluorescente em que o DNA genômico total isolado das

amostras teste e referência são marcados com haptenos e detectados pela ligação a agentes fluorescentes, submetidos a uma hibridação competitiva em cromossomos metafásicos normais. As taxas de fluorescência das amostras teste e referência ao longo do eixo longitudinal de cada cromossomo é quantificada pela análise da imagem digital. Os ganhos e ampliações ou perdas e deleções no DNA teste em comparação ao DNA de referência são identificadas por alterações na razão de fluorescência capturada ponto a ponto ao longo dos cromossomos metafásicos (KALLIONIEMI et al. 1993; BRYNDORF et al. 1995; INAZAWA et al. 2004).

A técnica de CGH *array* (aCGH) supera as limitações quanto a resolução das alterações de ganhos e perdas genômicos, já que por CGH cromossômico, o limite de detecção de perdas e ganhos de seqüências cromossômicas é de cerca de 10Mb (SNIJDERS et al. 2003; HUGHES et al. 2004; SHIH IE e WANG 2005; BEJJANI e SHAFFER 2006). O método de aCGH baseia-se nos mesmos princípios do CGH cromossômico; no entanto, há a substituição do uso de cromossomos metafásicos por plataformas contendo seqüências conhecidas de DNA (SNIJDERS et al. 2003; PINKEL e ALBERTSON 2005; SHIH IE e WANG 2005; BEJJANI e SHAFFER 2006). Assim, uma das vantagens do aCGH é a avaliação quantitativa das alterações no número de cópias de DNA em maior resolução.

Tais metodologias permitem definir regiões cromossômicas mais freqüentemente alteradas, e conseqüentemente, auxiliar na identificação de regiões de interesse que contenham genes candidatos a oncogenes e supressores de tumor (SNIJDERS et al. 2003; VAN BEERS e NEDERLOF

2006). A análise de aberrações cromossômicas por CGH é considerada uma importante ferramenta no estudo em tumores, já que amplificação de oncogenes ou deleção de genes supressores estão envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral e tem sido relacionadas com parâmetros clínico-patológicos como estadiamento, comprometimento linfonodal, infiltração tumoral e prognóstico.

1.2.1 CGH cromossômico e CEE

A técnica de CGH tem sido utilizada para a detecção de alterações genômicas em diversos tipos tumorais como em mama (OJOPI et al. 2002; VAN BEERS e NEDERLOF 2006; TAN e REIS-FILHO 2008), ovário (BERNARDINI et al. 2004), cabeça e pescoço (BERGAMO et al. 2000; REDON et al. 2001; SQUIRE et al. 2002; AKERVALL 2005; AKERVALL 2006) e pulmão (CHOI et al. 2007).

Há um número limitado de estudos que utilizaram CGH cromossômico em CEE (Quadro 1), incluindo linhagens celulares (TADA et al. 2000; YEN et al. 2003; SUGIMOTO et al. 2007) e amostras de tumor primário (YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; NOGUCHI et al. 2003; SHIOMI et al. 2003; UENO et al. 2003; YEN et al. 2003; KWONG et al. 2004; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008).

Dentre as alterações mais freqüentes identificadas associadas a CEE, foram relatados ganhos envolvendo as regiões cromossômicas 3q, 5p, 8q, 11q e 20q e perdas em 4p, 4q, 9p, 13q e 18q (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; ISHIZUKA et al. 2002; UENO et al. 2002; ARAI et al. 2003; NOGUCHI

et al. 2003; SHIOMI et al. 2003; UENO et al. 2003; KWONG et al. 2004; SU et al. 2006; WANG et al. 2006; CARNEIRO et al. 2008; QIN et al. 2008). Além da identificação de regiões cromossômicas envolvidas em perdas e ganhos genômicos, muitos estudos relacionaram tais alterações com fatores prognósticos em CEE.

A identificação de alterações cromossômicas relacionadas a presença de comprometimento linfonodal tem sido avaliada por alguns autores, por ser considerada como um importante fator prognóstico em CEE. TADA et al. (2000) e UENO et al. (2002; 2003) relataram que ganhos em 8q24-qter e em 20q12-qter e perdas em 1q22-qter estão associados a metástase linfonodal. Em dados apresentados por QIN et al. (2008), ganhos nas regiões 6p e 20p e perdas em 10p e 10q podem contribuir para metástase linfonodal em CEE. Mais recentemente, SAKAI et al. (2009) relataram que ganhos em 2q12-q14, 3q24-q26 e 7q21-q31 estão associados a comprometimento linfonodal.

Em estudo comparativo entre casos de CEE e adenocarcinoma de esôfago (ACE), SU et al. (2006) demonstraram que ganhos em 3q26-qter, 5q35-qter e 9q32-q34 foram mais freqüentemente detectadas em CEE. Em análise similar, WANG et al. (2006) identificaram diferenças nas alterações genômicas envolvendo ganhos em 8q, 3q, 5p e 20q e perdas em 3p, 8p, 5q, 17p e 18q, mais freqüentes em amostras de CEE. Adicionalmente, foi verificado que ganhos em 5p e perdas em 13p e 3p estavam associadas a estádios mais precoces, enquanto que ganhos em 3q e 8p eram mais freqüentes em estádios mais avançados (WANG et al. 2006).

YEN et al. (2001) relataram que perdas envolvendo 4p e 13q12-q14 e ganho em 5p estavam significativamente associados a estadios mais avançados. Os autores reportaram que perdas em 8p22-pter e 9p também foram associadas a estadios mais avançados, apesar de não atingir significância estatística.

Em estudo apresentado por UENO et al. (2002), os ganhos genômicos envolvendo as regiões 3q26-qter, 7q22, 8q24-qter e 11q13 e perdas em 3p11-p21.1, 4q32-q34, 9p21-p23 e 18q22-qter foram mais freqüentemente encontrados em casos em estadio I (UENO et al. 2002). Além destas regiões, os autores observaram que ganhos em 5p15, 14q21 e 20q12 e perdas em 11q22-q23 eram comumente encontrados em amostras em estadio III e IV (UENO et al. 2002).

Os ganhos envolvendo as regiões 5p e 7q e deleções em 4p, 9p e 11q foram descritos como fatores prognósticos significantes em CEE (YEN et al. 2001). Em outro estudo, foi verificado que a presença de três alterações envolvendo ganhos genômicos em 5p15, 8q24-qter e 14q21 influenciavam o prognóstico da doença, afetando negativamente a sobrevivência dos pacientes (UENO et al. 2002). A amplificação em 12p também foi associada a pior prognóstico (KWONG et al. 2004).

Em análise utilizando amostras de diferentes estágios na progressão tumoral em casos de CEE, SHIOMI et al. (2003) verificaram que ganhos em 3q, 8q, 11q13 e 14q estavam associados a eventos mais precoces durante a progressão tumoral, enquanto que perdas em 3p, 5q, 13q e 21q, e ganhos em 1p e Xq estavam relacionados a eventos mais tardios.

Além disso, outros fatores foram associados com regiões cromossômicas mais frequentemente alteradas. Os ganhos em 8q e 3q mostraram associação significativa com padrão de infiltração tumoral e pT, respectivamente (NOGUCHI et al. 2003). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que ganhos em 2p e perdas em 1p e 16p estava relacionado com invasão linfática (NOGUCHI et al. 2003). Alterações envolvendo ganhos genômicos em 8q24 foram associadas a tumores pouco diferenciados (YEN et al. 2001).

Quadro 1 - Sumários dos dados resultantes da análise de alterações no número de cópias de seqüências de DNA por CGH cromossômico em casos de CEE descritos em literatura.

Autor	N	Tipo de amostra	Ganho	Perda	Achados específicos
Tada et al. 2000	6	Linhagem celular	11q, 8q, Xq, 3q, 5p, 7p, 17p, 20q	18q, 4q, 9p	
Yen et al. 2001	46	Tumor primário	1q, 2q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12p, 12q, 14q, 17q, 20q, Xq	1p, 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 9q, 11q, 13q, 16p, 17p, 18q, 19p, 19q	-4p, -13q12, +5p: estadio +8q24: tumores pouco diferenciados +5p, +7q, -4p, -9p, -11q: pior prognóstico +8q24, +20q12, -11q22-23: metástase linfonodal
Ueno et al. 2002	51	Linhagem celular	3q, 8q, 11q	3p, 18q	+5p15, +14q21: metástase +5p15, +8q24, +14q21: pior prognóstico
Ueno et al. 2003	34	Tumor primário	1p, 1q, 2p, 2q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8p, 8q, 11q, 12p, 14q, 15q, 17q, 18p, 20p, 20q, Xq	3p, 4p, 4p, 4q, 5q, 9p, 11q, 13q, 16q, 18q, 19q, 21q	+8q24, +20q12: metástase linfonodal
Noguchi et al. 2003	53	Linhagem celular	3q, 5p, 8q, 11q, Xq	3p, 5q, 4p, 1p, Xp	+8q: infiltração tumoral +3q: pT +2p, -1p, -16p: invasão linfática +3q: estadiamento clínico
Yen et al. 2003	8	Linhagem celular	1p36, 1q32-qter, 3q26-qter, 5p15, 6p25-pter, 7p15-pter, 7q22, 8q24-qter, 9q34-qter, 11q13, 12p13-pter, 14q24, 15q25-qter, 16p12-pter, 16q23-qter, 18p, 19q11-q13.3, 20q13-qter, 22q13-qter, Xq24-qter	3p, 4, 5q15-q22, 6q16-qter, 7q32-qter, 9p, 18q21-qter	Comparação com achados pela técnica de SKY (<i>Spectral Karyotyping</i>) Validação por qPCR: <i>PIK3CA</i> e <i>TP63</i>
Shiomi et al. 2003	12	Linhagem celular	3q, 8q, 11q, 14q, Xq	3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 13q, 18q, 21q, Xp	+3q, +11q13, +14q: eventos precoces -3p, -5q, -13q, -21q, +1p, +Xq: eventos tardios

Cont/ Quadro 1

Autor	N	Tipo de amostra	Ganho	Perda	Achados específicos
Kwong et al. 2004	60	Tumor primário	3q, 8q, 5p, 7q, 15q, 20p, 1q, 7p, 2p, 12p	3p, 4q, 4p, 3q, 9p, 19p, 13p, 13q	+12p: pior prognóstico
Wang et al. 2006	37	Tumor primário	3q, 8q, 5p	3p, 8p, 9q, 13q	Comparação do perfil de alterações genômicas entre CEE e ACE
Sugimoto et al. 2007	10	Linhagem celular	5p, 5q, 7p, 8q, 11q, 14q, 16q, 20q	9q, 18q	Análise integrada de dados de expressão gênica e alterações cromossômicas - 97 genes apresentaram expressão gênica elevada e ganhos de seqüências de DNA
Qin et al. 2008	37	Tumor primário	3q, 8q, 5p	3p, 8p, 9q, 13q	+6p, +20p, -10pq: metástase linfonodal
Su et al. 2006	3	Linhagem celular	3q, 5q, 5p, 8q, 9q, 20q,	3p, 4q, 6q, 18	+3q, +5q, +9q: CEE +10q25: ACE
Tada et al. 2000	36	Tumor primário	3q, 8q23-qter, 11q13, 5p14-pter, 20q, 7q, 2p, 12p, 20p	18q, 3p, 9p, 5q14-q23, 4q, 13q, 11q22-qter	+8q23-qter, +20q, -11q22-qter: metástase linfonodal
Sakai et al. 2009	51	Tumor primário	17q12, 17q21, 3q29, 3q28, 8q24.2, 22q12, 3q27, 8q24.3, 1q22, 5p15.3, 22q13, 3q26.3, 8q23, 8q24.1, 9q34, 11q13, 17p12, 17q25, 20q12, 20q13.1, 1q32, 1q42, 20q13.2	Yp11.3, 3p26, Yq12, 13q21, 4q32, 13q22	+2q12-q12, +3q24-q26, +7q21-q31: metástase linfonodal e pior prognóstico +7p13-p21: metástase a distância

*ACE: Adenocarcinoma de esôfago

1.2.2 CGH *array* e CEE

A aplicação da técnica de CGH cromossômico em CEE permitiu a detecção de muitas alterações genômicas que foram associadas com diversos fatores prognósticos. No entanto, uma das desvantagens dessa metodologia é a incapacidade de detectar genes específicos mapeados nas regiões cromossômicas alteradas. Essa limitação pode ser resolvida com o desenvolvimento de técnicas de *microarray*, que permite a análise em larga escala e identificação de genes mapeados nestas regiões genômicas alteradas.

A técnica de CGH *array* tem sido utilizada na identificação de alterações no número de cópias do DNA em diversos tipos tumorais, como em câncer de mama (ROGATTO 2000; ANDRE et al. 2009), leucemia (YASAR et al. 2010), pulmão (KANG et al. 2009), cabeça e pescoço (FREIER et al. 2010; OR et al. 2010) e estômago (NAKAMURA et al. 2009; UCHIDA et al. 2010), entre outros.

Por se tratar de técnica relativamente recente, existem poucos dados em literatura de CGH *array* em CEE. A maioria dos trabalhos foi realizada utilizando diferentes plataformas baseadas em bibliotecas de BACs, com diferentes resoluções e tamanhos (Quadro 2).

Dados em literatura revelam a presença de alterações como ganhos na região 11q13, 8q24, 3q26, 20q13, 7p11 e 7p22 e perdas em 9p21 como freqüentemente relatadas nesse tipo tumoral (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008; SUGIMOTO et al. 2009).

Alguns genes de interesse que possam estar envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral foram mapeados nas regiões cromossômicas mais freqüentemente alteradas. Ganhos envolvendo 11q13 foram encontrados em todos os estudos já realizados em CEE (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008; SUGIMOTO et al. 2009). Genes envolvidos em importantes vias de sinalização encontram-se mapeados nessa região, dentre os quais, os mais freqüentemente relatados são *CCND1* (*cyclin D1*), *FGF3* (*fibroblast growth factor 3*), *FGF4* (*fibroblast growth factor 4*) e *CTTN* (*cortactin*) (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008). Adicionalmente, outros genes mapeados em 11q13 foram descritos em literatura, mas em menor freqüência, como *PAK1* (*p21 protein-activated kinase 1*) (KIM et al. 2006), *ORAOV1* (*oral cancer overexpressed 1*), *CPT1A* (carnitine palmitoyltransferase 1A) (HIRASAKI et al. 2007), *MYEOV*, *PPFIA*, *FAD*, *TMEM16A*, *CTTN*, *SHANK2* (HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008), *GAL*, *GSTP1*, *MRPL11*, *MRPL21*, *NDUFS8*, *POLA2*, *RAB1B*, *RNASEH2C*, *SF3B2*, *Y1F1A* (SUGIMOTO et al. 2009).

Outra alteração consistente em literatura em CEE envolve ganhos genômicos em 8q24 (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008; SUGIMOTO et al. 2009). Nessa região, encontram-se mapeados os genes *MYC* (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003) e *PTK2* (KIM et al. 2006).

Diversos genes de interesse foram identificados em outras regiões envolvidas em alterações genômicas. A identificação de alguns genes foram concordantes entre alguns dos estudos descritos, como *EGFR* em 7p12 (ISHIZUKA et al. 2002; CARNEIRO et al. 2008), *FHIT* em 3p14.2 (KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007) e *MTAP* em 9p21 (KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007). No entanto, diversos outros genes foram relatados, como por exemplo, *EGR2* (10q21.3), *LRP1B* (2q21.2), *RBP1*, *RBP2* (3q21-q22), *EIF5A2* (3q26.2), *CDKN2A* (9p21), *CLDN11* (3q26.2), *MDM* (12q14), *ERBB2* (17q12), *GALR1* (18q23), *PIK3CA* (3q26.32) entre outros (ISHIZUKA et al. 2002; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; SUGIMOTO et al. 2009).

HIRASAKI et al. (2007) verificaram a existência de associação entre a sobrevida global e a presença de alterações em determinadas regiões cromossômicas como Xq21.33, 3q27.1, 3q29, 4q21.1, 4q21.21, 4q25, 4q27, 4q31.1, 5q12.3, 8p21.3, 10q11.23, 10q25.2 e 10q26.2-q26.3. Essa associação também foi verificada por CARNEIRO et al. (2008), sendo que ganhos nas regiões 19p13.3, 3q11.2, 3q22.3 e 1p36.32 e perdas em 10p11.23, 9q34.3 e em 10q11.21 mostraram associação significativa com pior prognóstico.

Adicionalmente, outros fatores mostraram associação com dados resultantes da análise de alterações genômicas por CGH array. Relatos mostram que ganhos nas regiões 6p25.3, 12p13.33 e 17p13.1 estão presentes em tumores em estadio I, enquanto que casos em estadio II-IV mostraram mais freqüentemente ganhos em 12p13.33, 5p15.33, 20q13.33 e 11q13.3 (CARNEIRO et al. 2008). Nesse mesmo relato, os autores

verificaram que ganhos na região 7p22.3 estavam associados a metástase linfonodal; ganhos em 8q21.3 estavam associado a metástase a distância (CARNEIRO et al. 2008).

Quadro 2 - Sumários dos dados resultantes de análise de alterações genômicas por CGH *array* em casos de CEE descritos em literatura.

Autor	N	Amostra	Plataforma	Ganhos	Perdas
Ishizuka et al. 2002	32 13	Tumor primário (32) Linhagem celular (13)	BAC – AmpliOnc – Vysis (57 oncogenes)	1p, 1q, 2p, 3p, 3q, 7p, 7q, 8p, 8q, 11q, 12p, 12q, 17q, 19p, 20q, 22q, Xq	Não avaliado
Arai et al. 2003	20	Tumor primário	BAC – AmpliOnc – Vysis (57 oncogenes)	3q, 8q, 11q, 5p	3p, 4q, 21q, 9p, 5q
Kim et al. 2006	13	Tumor primário (13) Xeno-transplante (8)	BAC - GenoSensor Vysis (287 clones)	6p12.1-p21.1, 10q21.3, 11q13, 11q13-q14, 22qtel	1p12, 1qtel, 2q21.2, 3ptel, 3p24.3, 3p14.2, 3q21-q22, 3q26.2, 4ptel, 5qtel, 6q25.1, 7q32-q34, 8ptel, 8p22, 8p22-p21.3, 8p22, 8q24-qter, 9p21, 9p11.2, 10p13, 12qtel, 16q24.2- q24.3, 18q11.2, 18q21.3, 19ptel, 19qtel
Hirasaki et al. 2007	23	Tumor primário	BAC - MACarray Karyo (96.768 clones)	3q26.2, 3q27.2, 11q13.3-q13.4, 11q13.3, 3q26.33, 3q29, 8q24.21, 3q27.1, 3q28, 3q29, 3q25.31, 3q26.31, 3q26.32, 3q27.1, 3q27.3-q28, 3q28, 3q27.3, 3q29, 8q24.3, 3p22.3, 11q22.3, 3p14.2, 4q33-q34.1, 5q34, 11q25, 13q13.2, 18q22.3, 18q23, 3p24.3	3p14.2, 4q33-q34.1, 5q34, 11q25, 13q13.2, 18q22.3, 18q23, 3p24.3, 3p14.2, 3p12.2, 3p12.1, 4q12, 4q32.3, 4q34.3, 5q23.1, 5q23.3, 5q33.2-q33.3, 5q35.1, 11q23.1, 13q21.1, 4p14
Carneiro et al. 2008	30	Tumor primário	BAC (32k)	5p15.33, 7p22.3, 7p11.2, 8q24.13- q24.23, 8q24.3, 10q26.3, 11q13.3- q13.4, 12p13.33, 14q32.33, 16p13.3, 17p13.1, 19p13.3, 19q13.42, 20q13.33	3p26.3-p24.2, 3p14.2- p14.1, 3p14.1-p13, 5q12.3-q13.1, 8p23.2, 9p24.3-p24.2, 9p23, 9p21.3, 11q25
Sugimoto et al. 2009	10	Linhagem celular: 5 CEE 5 CCP	Oligoarray - Human Agilent (244k)	1q11, 2p22.2-p21, 3q25.32-q26.1, 3q26.2-q29, 5p15.33- p14.3, 7p22.2-p13, 7p12.3-p11.2, 7p11.2-p11.1, 8p11.21, 8q21.3- q22.1, 8q22.1, 8q22.2-q24.12, 8q24.13-24.22, 11q13.1-q13.3, 15q25.2, 20q11.1- q13.12	3p21.1, 3p14.2-p13, 3q26.1, 4q31.3, 18q12.1- q23

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Diante do contexto apresentado, o objetivo principal desse projeto é identificar alterações genômicas em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago, pela técnica de hibridação genômica comparativa.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar ganhos e/ou perdas genômicas em amostras de CEE, por técnicas de HR-CGH (do inglês, *High Resolution-CGH*) e aCGH (do inglês, *array CGH*).
 - 2) Selecionar as regiões genômicas e os genes mais frequentemente alterados que possam estar envolvidos na progressão tumoral, correlacionando com variáveis clínico-patológicas em CEE.
 - 3) Verificar a concordância entre as alterações detectadas por aCGH e HR-CGH, comparando os achados de ambas as metodologias.
-

MATERIALE MÉTODOS

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE CEE

O presente estudo compreende amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina (FFEP) e de tecido congelado de amostras de CEE usuais, que não foram expostos a tratamento prévio à cirurgia. Foram selecionadas 30 amostras de CEE, sendo que 11 são procedentes do Hospital Santa Teresinha (Erechim, RS) e 19, do Hospital A.C. Camargo (São Paulo, SP).

Em São Paulo, as amostras de tecido foram fornecidas pelo Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo e foram provenientes de pacientes atendidos no Departamento de Cirurgia Abdominal, no Hospital A. C. Camargo, São Paulo. Os exemplares do Rio Grande do Sul foram procedentes de pacientes submetidos à cirurgia de casos de CEE atendidos no Hospital Santa Teresinha, Erechim. Em todas as localidades, os pacientes foram convidados a participar do estudo após consentimento pós-informado.

Para a avaliação da presença de associação entre alterações genômicas e variáveis clínico-patológicas, foi realizada a revisão dos prontuários médicos e dos registros hospitalares do Departamento de Anatomia Patológica para todos os casos, sendo levantados dados relacionados à idade, sexo, tamanho tumoral, nível de infiltração tumoral,

grau histológico, estado linfonodal, presença de metástase e recidiva, margens cirúrgicas, invasão vascular e/ou linfática, além de informações relativas à evolução da doença e divididos como pacientes vivos sem doença, vivos com doença, mortos pela doença, mortos por outras causas e seguimento clínico perdido.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

3.2.1 Amostras de Tecido Fixado em Formalina e Embebido em Parafina (FFEP)

Inicialmente, um patologista realizou a análise de uma lâmina contendo a amostra tumoral em coloração por hematoxilina-eosina, para confirmação do diagnóstico. Conforme a necessidade, foi realizada microdissecção à laser ou manual (*Scrape*) das amostras para eliminação de tecido contaminante, ou seja, qualquer tecido que não fosse composto por células tumorais.

Para a extração do DNA genômico, foram utilizados os reagentes do *QIAmp DNA Micro Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante para cada tipo de microdissecção utilizada.

3.2.1.1 Microdissecção à laser - LCM (do inglês, *Laser Capture Microdissection*)

As lâminas contendo cortes de 3,5-4 μ m de espessura foram desparafinizadas em dois banhos em xilol de 2 min cada e hidratação em série de etanol 100% (2 min), 95% (1 min) e 75% (30 segundos) e água RNase free (30 segundos). Em seguida, foi realizada a coloração em hematoxilina (1 min) e em eosina (30 segundos), desidratação das lâminas em série de etanol 75% (30 segundos), 95% (30 segundos) e 100% (1 minuto) e xilol (5 min). As lâminas permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos.

Em seguida, os cortes foram microdissecados usando o sistema de microdissecção à laser *PixCell II* (Arcturus Engineering, CA). Resumidamente, nesse sistema, um polímero termoplástico acoplado a superfície de um *cap* é posicionado sobre o corte de tecido a ser microdissecado. O feixe de laser derreterá o polímero termoplástico, que então liga-se às células de interesse no corte de tecido. O tecido resultante da microdissecção a laser, aderido ao *Cap Sure*, é colocado em tubos de microcentrífuga.

A extração do DNA seguiu o protocolo recomendado pelo fornecedor do *QIAmp DNA Micro kit* (QIAGEN). Resumidamente, os tubos com as amostras microdissecadas foram invertidos em estufa a 56°C para permitir a ação do tampão *ATL* acrescido de proteinase K (fornecido *QIAmp DNA Micro kit*) para a digestão das amostras durante 16 horas. Posteriormente, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 14000 rpm por um

minuto e, então, o *cap* foi removido. Em seguida, foram adicionados 25 µL do tampão *ATL*, seguido de 50 µL do tampão *AL* contidos no kit, acrescido de 50 µL de etanol 100% e a reação foi incubada por cinco minutos, a temperatura ambiente. Após breve centrifugação a 14000 rpm por um minuto, todo o conteúdo contendo o lisado foi transferido para a coluna fornecida pelo *QIAmp DNA Micro kit* e centrifugada a 8000 rpm, por um minuto. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e foram adicionados 500µL do tampão *AW1*. Após centrifugação a 8000 rpm por um minuto e transferência da coluna para novo tubo coletor, adicionou-se 500µL do tampão *AW2*. Prosseguiu-se com a centrifugação a 8000 rpm por um minuto, transferência da coluna para novo tubo coletor e repetiu-se a centrifugação. Em seguida, a coluna foi novamente transferida para novo tubo de microcentrífuga, onde foi realizada a eluição do DNA obtido em 20-30µL de água ultra-pura estéril. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade). As concentrações e a qualidade do DNA extraído foram determinadas por leitura de absorvância a 230, 260 e 280 nm.

3.2.1.2 Microdissecção manual (*Scrape*)

Inicialmente, para a microdissecção manual, as lâminas de HE de amostras em FFEP de CEE foram avaliadas para delimitação da região a ser microdissecada, contendo apenas células tumorais. Para cada caso, foram utilizados cerca de 5-10 lâminas contendo cortes de 3,5-4µm de espessura. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foi realizada a microdissecção,

raspando-se o tecido na região previamente delimitada. O material resultante da microdissecção foi inserido em tubos de 1,5mL.

Após a realização de microdissecção manual, o material resultante foi submetido a desparafinização, adicionando 1200µL de xilol em tubo de 1,5mL contendo o raspado da amostra obtido. Após centrifugar a 14000 rpm, por cinco minutos, removeu-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta, tomando o cuidado para não remover o sedimento. Se necessária, a desparafinização com xilol foi repetida. Para a remoção do xilol, foram adicionados 1200µL de etanol 100%, homogeneizados gentilmente e centrifugados a 14000 rpm, por cinco minutos. Após a remoção do sobrenadante, esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Após deixar secar o pellet, foram incubados a 56°C para permitir a ação de 180 µL de tampão *ATL* acrescido de 20 µL de proteinase K (fornecido *QIAmp DNA Micro kit*) para a digestão das amostras durante 16 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, por um minuto. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão *AL* e homogeneizados gentilmente. Foram acrescentados 200 µL de etanol 100% e incubados por cinco minutos, a temperatura ambiente. Após breve centrifugação a 14000 rpm por um minuto, todo o conteúdo contendo o lisado foi transferido para a coluna fornecida pelo *QIAmp DNA Micro kit* e centrifugados a 8000 rpm, por um minuto. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e 500µL do tampão *AW1* foram adicionados à reação. Após centrifugação a 8000 rpm por um minuto, a coluna foi transferida para novo tubo coletor e foram adicionadas 500µL do tampão *AW2*. Prosseguiu-se a centrifugação a 8000 rpm por um

minuto, transferência da coluna para um novo tubo coletor e repetiu-se a centrifugação. Em seguida, a coluna foi transferida para novo tubo de microcentrífuga e realizada a eluição do DNA obtido em 20-100µL de água ultra-pura estéril. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro. As concentrações e a qualidade do DNA extraído foram determinadas por leitura de absorvância a 230, 260 e 280 nm.

3.2.2 Amostras congeladas

Inicialmente, um patologista realizou a análise de uma lâmina em coloração por hematoxilina-eosina de cada amostra, para confirmação do diagnóstico. Apenas as amostras que apresentam, no mínimo, 80% de células tumorais são submetidos à extração de DNA. Se necessário, é realizada semi-microdissecção das amostras de tecido cirúrgico para eliminação de tecido contaminante.

Para a extração do DNA genômico das amostras, foi utilizado o método padrão fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Em tubo de 1,5mL, foi adicionado amostra de tecido congelado em 600µL de tampão de digestão *Cell Lysis Solution* (Gentra Puregene Blood Kit - Qiagen) e 15µL de proteinase K 20µg/µL (Gentra Puregene Blood Kit - Qiagen). Após incubação a 55°C, com agitação, por 18 horas, transferiu-se o conteúdo para um tubo *Phase Lock Gel* (PLG) e adicionou-se 600µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos, a 13200 rpm e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo PLG. Foram adicionados 600µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugados por 10

minutos a 13200 rpm. Adicionou-se 600µL de clorofórmio diretamente no tubo PLG e, após centrifugação por 10 mim, a 13200 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo 2,0mL. Para precipitação do DNA, foram adicionados 0,5µL de glicogênio (20mg/mL) e 800µL de etanol 100% gelado, homogeneizados por inversão e incubados a -20°C, por 1 hora. Em seguida, centrifugou-se por 30 minutos, a 4°C e 14000 rpm. Após remoção do sobrenadante cuidadosamente com a pipeta, o sedimento foi lavado em 1mL de etanol gelado 70% e centrifugado por 2 minutos, a 4°C e a 14000 rpm. O sobrenadante foi removido e o procedimento para lavagem do sedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo então, removido o sobrenadante. Finalizando a última lavagem, removeu-se o sobrenadante e o *pellet* foi mantido a 42°C até para secagem. O *pellet* foi ressuspendido em, aproximadamente, 50µL de água ultra-pura estéril, incuba-se a 55°C por 10 minutos e, em seguida, acondicionados a 4°C (8 a 12 horas).

Em seguida, as amostras foram tratadas com *RNAse* 100mg/mL e purificadas com o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, seguindo os parâmetros de pureza e qualidade sugeridos pela Agilent.

3.3 HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH)

3.3.1 CGH de Alta Resolução (HR-CGH)

3.3.1.1 Primeira Amplificação por *SCOMP* (do inglês, *Single Cell Comparative Genomic Hybridization*)

A amplificação e a marcação do DNA genômico das amostras, assim como a hibridação e análise dos resultados foram realizadas de acordo com protocolos padronizados utilizados no Laboratório NeoGene, sob a coordenação do Dra. Silvia Regina Rogatto.

O DNA obtido a partir de amostras FFEP foi diretamente utilizado na metodologia de *SCOMP*. As reações de clivagem com a endonuclease de restrição *MseI*, ligação dos adaptadores e primeira amplificação pela PCR foram realizadas no mesmo tubo para prevenir a perda de fragmentos genômicos. Inicialmente, o DNA foi submetido à clivagem com 24U da endonuclease de restrição *MseI* (alta concentração, New England Biolabs), em tampão universal (10mM de Tris-acetato pH 7.5, 10mM de acetato de magnésio, 50mM de acetato de potássio) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente, a enzima foi inativada a 65°C durante 5 minutos.

Em um tubo separado, os adaptadores foram formados pelo pareamento dos oligonucleotídeos *LIB1* (5'-AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT-3') e *ddMseI* (5'-TAACTGACAGCdd-3'). Uma solução contendo 15nM de cada oligonucleotídeo em tampão universal foi submetida a um gradiente decrescente de temperatura de 65° a 15°C (1 minuto por °C). Após o pareamento dos oligonucleotídeos adaptadores, foram adicionados 1µL de dATP 10mM e 5U de T4 DNA ligase (Invitrogen – Life Technologies). Esta mistura foi transferida ao DNA tratado com a endonuclease *MseI* e incubada a 15°C por 16 horas.

Após a ligação dos adaptadores, a amplificação primária foi efetuada utilizando o kit *Expand Long PCR System* (Roche). A reação foi realizada em um volume final de 41µL contendo 2.5mM de cada dNTP, 3.0µL de *Expand Long Template buffer 1*, 1.0µL *Expand Long Template Pol Mix 3,5U/µL* e 35µL de água ultra-pura estéril. A amplificação foi realizada em um termociclador programável PTC 200 (MJ Research) e consiste de 1 ciclo de 68°C por 3 minutos; 15 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 8 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 68°C por 1 minuto e 45 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 22 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 53 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 1 ciclo de 68°C por 3 minutos e 40 segundos. Em seguida, os produtos amplificados são purificados usando o *QIAquick PCR Amplification Kit* (QIAGEN).

Incorporação de Nucleotídeos Marcados

Dois µL do produto purificado foram utilizados como molde numa segunda reação de amplificação para marcação dos fragmentos. As condições de reação foram de 4µL de *Expand Long Template buffer 1*, 6µL do oligonucleotídeo *LIB1* 10µM, 1,4µL de *7/8 Nucleotide Mix* (10mM de cada dGTP, dATP e dCTP + 8,75µL de dTTP) e 1,75µL de digoxigenina 11-dUTP (para o DNA de referência) ou biotina 16-dUTP (para o DNA teste), 2µL de *Expand Long Template Polimerase mix* 5U/µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2

minutos; 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 20 segundos adicionais/ciclo. O oligonucleotídeo *LIB1* foi removido pelo tratamento com a enzima de restrição *TruI*, conforme as instruções recomendadas pelo fornecedor. Posteriormente, a enzima foi inativada a 65°C por 3 horas.

3.3.1.2 Hibridação e Lavagens

Alíquotas contendo 8µg de DNA teste (18µL de DNA marcado com biotina 16-dUTP) e 8µg do DNA de referência (18 µL de DNA marcado com digoxigenina 11-dUTP) foram co-precipitadas na presença de 100 µL *Human Cot-1 DNA* e de 10µL DNA de esperma de salmão, 10µL de acetato de sódio 3M e 400µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a -20°C durante uma noite ou, alternativamente, a -70°C durante 1 hora. Após centrifugação a 14000 rpm, 4°C durante 45 minutos, o precipitado foi lavado em etanol a 70%, centrifugado a vácuo. Posteriormente, 30µL de *Hybrisol VII* foram adicionados ao precipitado e foi realizada a desnaturação à 75°C por 10 minutos. Em seguida, o precipitado foi mantido à 37°C por, no mínimo, 1h para pré-anelar.

Para a preparação das lâminas, foram separadas aquelas com metáfases obtidas a partir da cultura de linfócitos de sangue periférico (Moorhead *et al.*, 1960), com cromossomos contendo aproximadamente 800 bandas, não sobrepostos e idade aproximada de 30 dias (estocadas em temperatura ambiente).

As lâminas foram desidratadas em etanol 70%, 80% e 90% por 5 minutos cada, e secas a temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas, estas foram incubadas em 10% pepsina e 0,01N HCl a 5min (37°C). As lâminas foram transferidas para 2XSSC por 5 min (37°C), seguidas de desidratação em série de etanol 70%, 80% e 90%. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em 70% formamida/2XSSC durante 2 minutos à 72°C para desnaturação. Após a desnaturação, as lâminas foram transferidas imediatamente para uma série de etanol 70%, 80% e 100% gelado por 5 minutos cada. As lâminas foram secas a temperatura ambiente antes da hibridação. A hibridação foi realizada pela adição de 30µL da sonda em lamínula, aplicação sobre a lâmina, vedação com *rubber cement* e incubação em câmara escura à 37°C por 72 horas. Posteriormente, foi realizada a lavagem em formamida 50%/2XSSC por 8 minutos e em solução de 2XSSC (3 vezes), à 45°C (soluções pré-aquecidas). Em seguida, foram acrescentados, sob lamínula, 40µL de *Block I* (0,1M Tris HCl; 0,15M NaCl; 0,5%BSA - Boehringer) e 40µL de *TNB* (3% BSA; 0,1% Tween20; 4XSSC) e incubados por 30 minutos à 37°C (câmara escura). O DNA biotilado foi detectado utilizando avidina-fluoresceína isotiocianato (FITC) (Roche), enquanto o DNA com a digoxigenina foi detectado através da *anti-dig-rhodamina* (Boehringer Mannheim), na proporção de 9:1. As lâminas foram sobrepostas com lamínula e incubadas em câmara escura durante 30 minutos à 37°C. Em seguida, a lavagem foi realizada em 4XSSC/0,1% de Tween 20 à 45°C durante 5 minutos, por três vezes. As lâminas foram

contracoradas com 8µL de *VectaShield Mounting Media for Fluorescence with DAPI* (Vector).

3.3.1.3 Análise da HR-CGH

As imagens foram capturadas usando o microscópio de fluorescência *Olympus AX61* (Olympus Optical, Hamburg, Germany) equipado com uma câmera CCD (Photometrics CH 250, Huntington Beach, CA). O software *Applied Spectral Imaging CGH View 3.0* foi usado para captura e análise das imagens. O software calcula uma média do sinal de FITC:rodamina e expressa este achado como um padrão verde:vermelho para cada metáfase com um limite de 99,5% de confiança.

Uma biblioteca com amostras normais diferencialmente marcadas, usando o mesmo procedimento das amostras teste, foi construída para selecionar os limites superior e inferior dos ganhos e perdas cromossômicas (intervalos de referência padrão). Cinco amostras (normal X normal) foram marcadas diferencialmente (biotina X digoxigenina). Foram analisadas 200 células normais para elaboração do perfil de variação de ganhos e perdas considerados como normais. Os intervalos de referência foram extraídos da biblioteca que delimita o padrão normal dos experimentos considerando os mesmos critérios de seleção de metáfases, padrão de hibridação e condições gerais de análise pelo programa usado. O intervalo de referência é assinalado em azul e representa o intervalo de confiança normal. As barras indicando perdas (vermelho) e ganhos (verde) aparecem quando o intervalo de referência da amostra não se sobrepõe ao do intervalo de

referência. O arquivo gerado da biblioteca de casos normais foi utilizado na comparação de cada um dos casos tumorais.

Para cada caso, foram capturadas 20-25 metáfases, analisadas por bandamento G reverso numa resolução de 400-500 bandas. Cromossomos sobrepostos foram excluídos da análise. A análise do perfil de interpretação para ganhos e perdas foram consideradas somente em células que mostraram um padrão homogêneo de hibridação (em média 15 a 18 células). As alterações foram detectadas usando intervalos de referencia como descrito por Kirchhoff *et al* (1998). A descrição das alterações por HR-CGH foi baseada na recomendação do *ISCN* (2009).

A identificação de alterações em regiões mínimas comuns entre os 21 casos avaliados foi realizada considerando um *cutoff* de seis casos. Para a realização da comparações entre os achados de HR-CGH e de aCGH, a identificação de alterações em regiões mínimas comuns somente dos nove casos pareados, cujas amostras congeladas foram submetidas a metodologia de aCGH, foi realizada considerado o *cutoff* de quatro casos.

3.3.2 CGH array (aCGH)

Para a técnica de aCGH, foi utilizado o DNA genômico extraído de amostras tumorais congeladas.

A análise de aCGH foi realizada utilizando a plataforma *Human Genome High-Definition CGH Microarray 4x44K* (Agilent), composta por oligonucleotídeos de 60pb, representando cerca de 43000 seqüências humanas codificadoras e não-codificadoras, incluindo genes relacionados ao

câncer. Para as reações de marcação, hibridação e lavagem das lâminas, foram utilizadas reagentes da *Agilent (Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis kit)*, seguindo as recomendações do fabricante.

3.3.2.1 Fragmentação e marcação do DNA genômico

O DNA obtido a partir de amostras congeladas de CEE foram submetidas a fragmentação e marcação das amostras, seguindo o protocolo padrão do método ULS (*Universal Labeling System*), recomendado pela *Agilent* o qual é baseado na marcação não-enzimática por fluorescência diferencial entre as amostras de DNA genômico normal e do caso tumoral. Como referência, foi utilizado o DNA genômico universal masculino (Promega). Inicialmente, é realizada a fragmentação, partindo de 500ng em um volume de 8 μ L do DNA genômico, tanto da amostra referência quanto tumoral, para obtenção de fragmentos com tamanho inferior a 7kb. As amostras foram aquecidas a 95 $^{\circ}$ C, por 3 a 10 minutos, dependendo da integridade do DNA antes de iniciar a fragmentação. Antes de prosseguir para a marcação, as amostras foram mantidas em gelo, por no mínimo, 3 minutos. Para a etapa de marcação, o DNA genômico fragmentado foi adicionado na reação contendo 0,5 μ L de água ultra-pura estéril, 0,5 μ L de *ULS-Cy3* (amostra teste) ou *ULS-Cy5* (amostra referência) e 1 μ L de *10x Labeling Solution*. As reações foram incubadas a 85 $^{\circ}$ C, por 30 minutos, e em seguida, mantidas em gelo. As amostras foram então purificadas utilizando as colunas *Agilent KREApure columns*, de acordo com as instruções do

fabricante. Após a purificação, as amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro, para verificar a eficiência de marcação por fluorescência, de acordo com parâmetros indicados pela Agilent.

3.3.2.2 Hibridação e lavagem

As amostras de DNA já marcadas e purificadas que apresentaram eficiência de marcação entre 1,5 a 3% foram submetidas as reações de hibridação. Para essa etapa, foram utilizados reagentes contidos no *Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit* (Agilent), seguindo indicações do fabricante. As amostras teste e referência que apresentaram eficiência de marcação e concentração final semelhantes foram combinadas e adicionadas a reação contendo 5µL de *Human Cot-1DNA 1,0mg/mL* (Invitrogen), 1µL de *Agilent 100x Blocking Agent* e 55µL de tampão *Agilent 2x Hi-RPM Hybridization Buffer*. As amostras foram desnaturadas a 95°C, por 3 min e incubadas a 37°C, por 30 min. Ao final da incubação, foram adicionados 27µL de *Agilent-CGH Block*, necessários para minimizar efeitos de *background* na hibridação. Em seguida, conforme instruções do fabricante, foram aplicados 100µL da amostra na lâmina de *microarray*, que foram incubadas em estufa de hibridação a 65°C, a 20rpm, por 24 horas.

Após a etapa de hibridação, as lâminas foram lavadas em *Oligo aCGH Wash Buffer 1*, em temperatura ambiente, por 5 minutos; em *Oligo aCGH Wash Buffer 2*, a 37°C, por 1 minuto; em acetonitrila, em temperatura ambiente, por 10 segundos e em *Stabilization and Drying Solution*, em temperatura ambiente, por 30 segundos.

3.3.2.3 Análise dos dados – aCGH

As lâminas foram digitalizadas utilizando o *DNA microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology (Agilent)*, utilizando-se o *Scan Control Software 8.1*. Os dados foram extraídos pelo programa *Feature Extraction v 10.1.1.1*, seguindo parâmetros recomendados pela Agilent.

Os dados já normalizados pelo programa *Feature Extraction* foram analisados utilizando o programa *Agilent DNA Analytics Software v4.0* (Agilent®). Para a detecção das alterações genômicas, foi utilizado o algoritmo estatístico ADM-2, que identifica regiões genômicas com diferenças no número de cópias em uma dada amostra, baseada no \log_2 *ratio* dos sinais de fluorescência emitidas pelas sondas da amostra teste e referência. Esse algoritmo procura por intervalos em que a média dos \log_2 *ratio* dos sinais medidos em uma dada região excedem um específico *threshold* (DE SMITH et al. 2007; NIINI et al. 2010). No presente estudo, foi utilizado o *threshold* de 6.0. Apenas as alterações que tinham no mínimo três sondas consecutivas com razão \log_2 *ratio* alteradas foram consideradas como uma possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico. Para eliminar grandes alterações com baixos valores de \log_2 *ratio*, foi aplicado o algoritmo de correção *Fuzzy Zero*.

Alterações no número de cópias (CNVs) foram comparadas com os dados depositados no *Database of Genomic Variants* (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) e com os dados obtidos de 83 mulheres brasileiras normais, obtidos de um estudo paralelo da equipe para filtrar alterações consideradas como variações normais na população. As regiões

genômicas alteradas associadas a mais de três CNVs já descritas foram excluídas da análise, após avaliação visual no programa *Agilent DNA Analytics Software v4.0* (Agilent).

Alterações presentes nos cromossomos X e Y foram descartadas das análises, devido ao *sex mismatch* entre as amostras teste e referência utilizadas nas reações de hibridação.

Em uma análise comparativa, apenas as alterações presentes em, no mínimo, cinco casos foram considerados como mais freqüentes em regiões mínimas comuns entre todos os 18 casos de CEE avaliados. Para a comparação entre os resultados obtidos pelas metodologias de HR-CGH e aCGH, foram apenas consideradas as alterações em regiões mínimas comuns presentes em, no mínimo, três dos nove casos pareados.

A listagem dos genes de interesse apresentados no presente estudo obedeceu as regras de nomenclatura do “*HUGO (The Human Genome Organization) Gene Nomenclature Committee*” (HGNC).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita através do programa SPSS for Windows, versão 13.0, SPSS Inc., utilizando o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher para verificar diferenças entre alterações cromossômicas e dados clínico-patológicos (grau de diferenciação, invasão linfática e venosa, comprometimento linfonodal e estadiamento). Para todas as análises, serão considerados significativos os valores de $\alpha < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados 30 casos de CEE para serem avaliados no presente estudo, sendo que 11 são procedentes do Hospital Santa Teresinha (Erechim, RS) e 19, do Hospital A.C. Camargo (São Paulo, SP). Vinte e um casos de CEE foram avaliados por HR-CGH e 18 casos por aCGH. Nove casos pareados (amostras em FFEP e congeladas) foram avaliados por ambas as metodologias (Quadro 3).

As características das amostras avaliadas podem ser vistas na Tabela 1. A maioria dos casos é composta por pacientes do sexo masculino (73,3%) com idade variando de 46 a 74 anos (média=60,3± 5,9 anos). Metade dos casos (50%) foram considerados como moderadamente diferenciados (G2). A análise do nível de infiltração revelou que em três (10%) casos o tumor atingiu a lâmina basal, 11 (36,7%) a camada muscular e, em 15 (50%) casos houve o comprometimento da adventícia. Quanto a invasão vascular, foi observada invasão venosa e linfática em 2 (6,7%) e 5 (16,7%) casos, respectivamente. Comprometimento linfonodal foi encontrado em 46,7% dos casos. Os casos apresentando estadio II foram mais freqüentes (40%) dentro dessa casuística. A maioria dos casos (53.3%) está vivo sem a doença, enquanto que 11 (36,7%) morreram devido ao câncer (Tabela 4).

Quadro 3 - Relação dos 30 casos de CEE envolvidos no presente estudo.

Caso	Procedência	HR-CGH (FFEP)	CGH array (congelado)
ESOP1	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	X
ESOP2	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	X
ESOP3	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	-
ESOP4	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	X
ESOP5	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	X
ESOP6	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	-
ESOP7	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	X
ESOP8	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	X
ESOP9	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	X
ESOP10	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP11	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	-
ESOP12	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	X
ESOP13	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	-
ESOP14	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	-
ESOP15	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	X
ESOP16	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP18	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP19	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP20	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP22	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP28	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	-
ESOP29	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	-
ESOP34	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	-
ESOP38	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	X	-
ESOP39	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	-	X
ESOP40	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	-
ESOP42	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	-
ESOP43	Hosp. Sta. Teresinha, Erechim, RS	X	-
ESOP44	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X
ESOP46	Hosp. A. C. Camargo, São Paulo, SP	-	X

Tabela 1 - Sumário dos dados clínico-patológicos dos 30 casos de CEE levantados para esse estudo.

Variável	Categoria	N (%)
Gênero	Masculino	22 (73,3)
	Feminino	8 (26,7)
Grau histológico	G1	2 (6,7)
	G2	15 (50,0)
	G3	13 (43,3)
	G4	0
Nível de infiltração	Lâmina	3 (10,0)
	Muscular	11 (36,7)
	Adventícia	15 (50,0)
	Não informado	1 (3,3)
Invasão vascular	Não observado	28 (93,3)
	Presente	2 (6,7)
Invasão linfática	Não observado	25 (83,3)
	Presente	5 (16,7)
Comprometimento linfonodal	Não	15 (50,0)
	Sim	14 (46,7)
	Não informado	1 (3,3)
Estadiamento	I	3 (10,0)
	II	12 (40,0)
	III	7 (23,3)
	IV	7 (23,3)
	Não informado	1 (3,3)
Evolução da doença	Morte por câncer	11 (36,7)
	Vivo sem doença	16 (53,3)
	Vivo com câncer	3 (10,0)

4.2 HR-CGH

Entre os 21 casos de CEE que foram avaliados por HR-CGH, onze casos são provenientes de São Paulo e 10, de Erechim, RS (Quadro 3). Aproximadamente 20 metáfases foram capturadas e analisadas para cada caso, sendo utilizadas na elaboração do perfil final de interpretação. A qualidade tanto da hibridação quanto do perfil individual de cada caso foi considerada satisfatória para amostras FFEP como pode ser exemplificado na Figura 1.

Para a identificação de regiões de perdas e ganhos genômicos, cada um dos casos foi avaliado individualmente. Tais regiões estão sendo apresentadas no Anexo 2. No total, foram detectadas 1038 alterações genômicas, com média de 50 alterações ($dp=10,8$ alterações) em cada caso. O caso ESOP28 apresentou o maior número de alterações cromossômicas, totalizando 64 eventos, dentre os quais 27 estavam envolvidos em perdas e 37, em ganhos genômicos. O menor número de alterações foi encontrado em ESOP9, que mostrou 28 alterações, dos quais 19 regiões estavam envolvidas em perdas e 9, em ganhos genômicos.

Foram identificadas 155 alterações cromossômicas, envolvendo regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos, presentes em mais de 30% dos 21 casos avaliados (Figura 2). Houve uma predominância de perdas genômicas, totalizando 111 alterações, quando comparadas as regiões mínimas de ganhos genômicos (44). As regiões mínimas comuns de

perdas e ganhos genômicos entre os casos avaliados encontram-se sumarizadas na Tabela 2.

Entre as alterações em regiões mínimas comuns, as perdas mais freqüentes envolveram as regiões 1q41, 1q42, 2p24-p23, 4p15.3-p15.2, 5q34-q35, 7p15, 7p21, 7q34-q36, 8q23, 9p13, 9p23-p21, 11q23-q25, 12q23-q24, 12q24.1-q24.2, 12q24.3, 13q22, 16p12, 16p13.2-p13.1, 16q21-q22, 18p11.3-p11.2, 18q12, 18q23, 19p13.1, 19p13.3-p13.2, 20p12-p11.2 e 22q13. As regiões envolvidas em ganhos genômicos mais comuns foram 1q22-q23, 2p11.2, 2p12, 2q11.2, 2q22, 3p14, 3p21, 3q13.1-q13.3, 4q24, 4q28, 6q12, 7q11.2, 7q21, 10q23, 11p12-p11.2, 11q12 e 11q13.

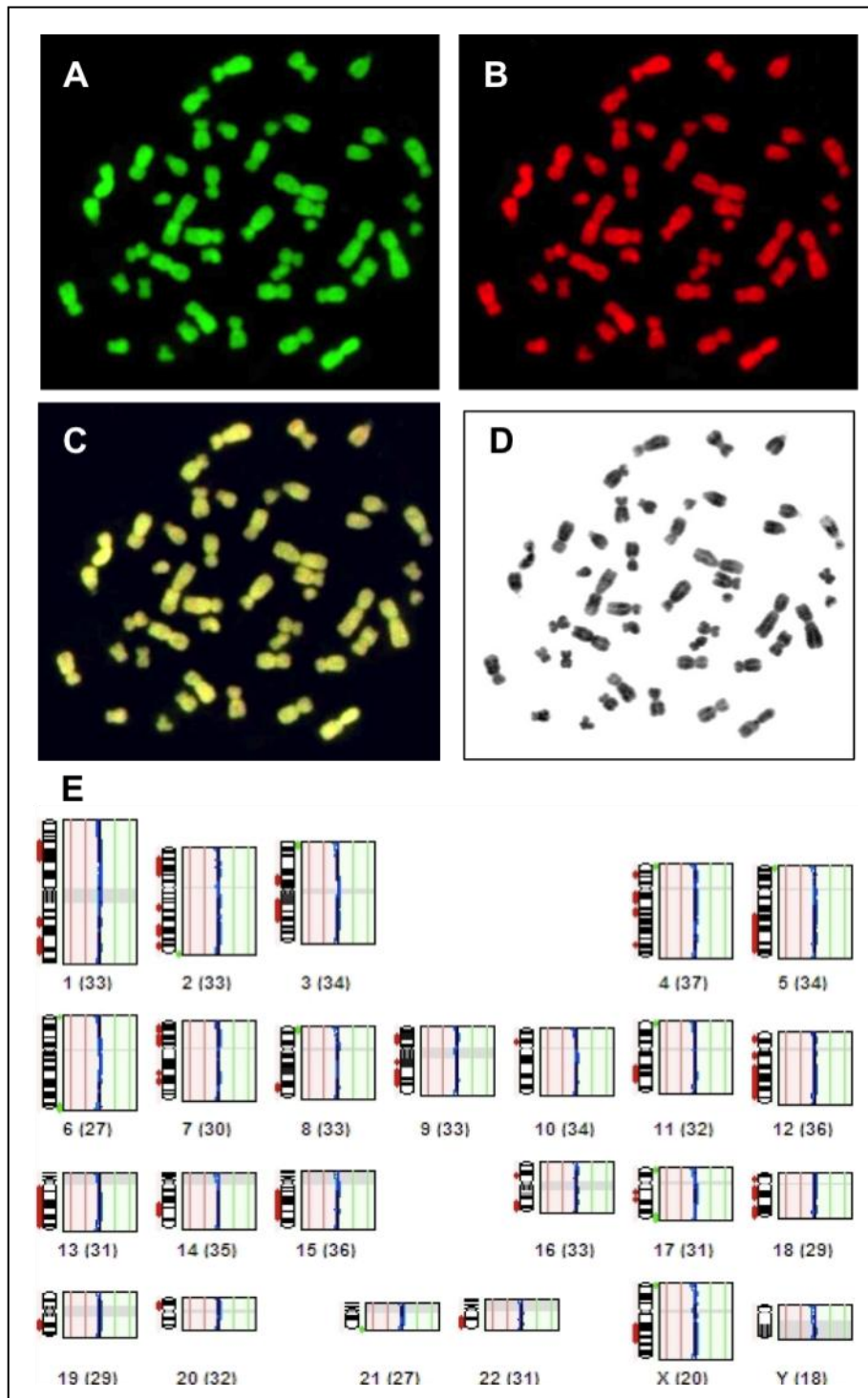


Figura 1 - Padrão de hibridação de HR-CGH da amostra ESOP15. (A) Metáfase capturada com filtro no espectro verde; (B) espectro vermelho; (C) filtro triplo; (D) Padrão de Banda G (DAPI-reverso) e (E) Ideograma representativo das perdas e ganhos genômicos considerando todas as metáfases analisadas (17) . O desvio da linha azul para a esquerda indica perda (vermelho) e para a direita indica ganho (verde). $p < 0,05$.

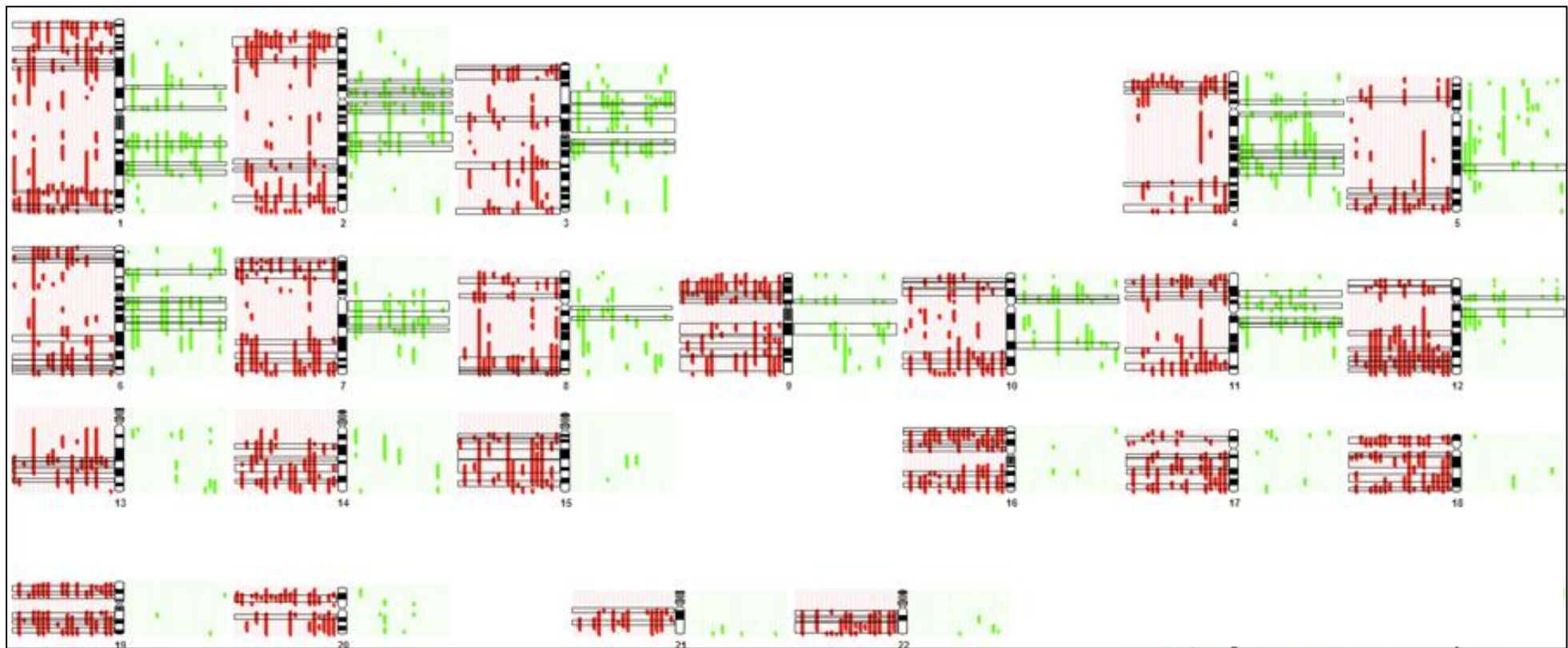


Figura 2 - Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas e identificadas por HR-CGH ($P < 0,05$) entre as 21 amostras de CEE. As regiões mínimas comuns aos casos estão destacadas (retângulos pretos). Ordem das amostras, a partir do cromossomo: ESOP1, ESOP11, ESOP12, ESOP13, ESOP14, ESOP15, ESOP2, ESOP28, ESOP29, ESOP3, ESOP34, ESOP38, ESOP4, ESOP 40, ESOP42, ESOP43, ESOP5, ESOP6, ESOP7, ESOP8 e ESOP9.

Tabela 2 - Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as 21 amostras de CEE avaliadas (ESOP1, ESOP2, ESOP3, ESOP4, ESOP5, ESOP6, ESOP7, ESOP8, ESOP9, ESOP11, ESOP12, ESOP13, ESOP14, ESOP15, ESOP28, ESOP29, ESOP34, ESOP38, ESOP40, ESOP42 e ESOP43). O número de casos em que a alteração foi identificada encontra-se entre parênteses.

PERDAS GENÔMICAS	GANHOS GENÔMICOS
1p31 (10), 1p33 (11), 1p36.3-p36.1 (11), 1q41 (17), 1q42 (13), 1q43 (12), 1q44 (12), 2p16-p21 (7), 2p24-p23 (14), 2q31 (6), 2q32 (5), 2q36-q37 (10), 3p13-p12 (6), 3p24 (9), 3p25 (6), 3q21-q23 (7), 3q29 (10), 4p15.1 (7), 4p15.3-p15.2 (16), 4q31.2 (6), 4q32-q33 (6), 5p14-p13 (6), 5q32 (6), 5q33 (7), 5q34-q35 (14), 6p22 (6), 6p23 (9), 6p25 (8), 6q22 (6), 6q24 (9), 6q25 (8), 6q26 (7), 6q27 (7), 7p15 (14), 7p21 (14), 7p22 (10), 7q31 (9), 7q32-q33 (7), 7q34-q36 (14), 8p12 (6), 8p22 (10), 8q23 (13), 8q23-q24.1 (12), 8q24.2 (10), 8q24.3 (9), 9p12 (9), 9p13 (14), 9p23-p21 (17), 9q21 (8), 9q22 (9), 9q31 (10), 9q32-q34 (9), 10p12 (6), 10p13 (7), 10p14 (6), 10q24-q25 (11), 10q25-q26 (10), 11p13 (6), 11p14 (8), 11p15 (12), 11q22 (6), 11q23-q25 (13), 12p12 (8), 12p13 (7), 12q15-q21 (8), 12q22 (11), 12q23-q24 (17), 12q24.1-q24.2 (17), 12q24.3 (16), 13q21 (12), 13q22 (13), 13q31 (9), 13q32 (7), 14q13-q21 (9), 14q22 (7), 14q24 (11), 14q31-q32 (11), 15q12 (7), 15q14 (11), 15q21 (8), 15q22-q24 (10), 15q25-q26 (11), 16p11.2 (9), 16p12 (14), 16p13.2-p13.1 (14), 16p13.3 (11), 16q21-q22 (14), 16q23 (12), 17p12 (9), 17q21 (9), 17q22 (12), 17q24-q25 (12), 18p11.3-p11.2 (15), 18q11.2 (11), 18q12 (14), 18q21-q22 (9), 18q23 (15), 19p13.1 (14), 19p13.3-p13.2 (13), 19q13.1 (12), 19q13.2 (14), 19q13.3-q13.4 (12), 20p12-p11.2 (17), 20q11.2-q12 (9), 20q13.1-q13.2 (9), 21q11.2-q21 (8), 21q22 (11), 22q11.2 (10), 22q12 (10), 22q13 (16)	1p22-p21 (6), 1q22-q23 (14), 1q31 (9), 2p11.2 (11), 2p12 (9), 2p13 (6), 2q11.2 (11), 2q12-q13 (8), 2q22 (10), 2q24 (6), 3p12 (8), 3p14 (11), 3p21 (12), 3q12-13.1 (7), 3q13.1-q13.3 (9), 4p13-p12 (6), 4q12-q13 (7), 4q24 (9), 4q25-q26 (7), 4q26-q27 (7), 4q28 (9), 5q23 (8), 6p21.3 (8), 6q12 (9), 6q13-q14 (8), 6q16 (7), 6q21 (8), 7q11.2 (9), 7q21 (9), 7q22 (8), 8q11.2 (6), 8q13 (7), 9q21 (8), 10p11.2 (8), 10p12-p11.2 (7), 10q23 (9), 11p12-p11.2 (9), 11p15 (7), 11q12 (15), 11q13 (13), 12p11.2 (8), 12q12-q13 (6),

4.2.1 Associação entre alterações genômicas identificadas por HR-CGH e dados clínico-patológicos

No presente estudo, foi verificada a existência de associações entre alterações cromossômicas identificadas por HR-CGH e dados clínico-patológicos, como grau de diferenciação, invasão venosa e linfática, comprometimento linfonodal e estadiamento (Tabela 3).

Foi observada associação significativa entre comprometimento linfonodal e ganho genômico em 1q12-q13 ($p=0,041$) e perdas em 3p24 ($p=0,024$), 3p25 ($p=0,005$) e em 13q31 ($p=0,020$). Comprometimento linfonodal foi mais freqüente em casos que apresentaram perda genômica em 13q31. Inversamente, a presença de metástase linfonodal foi mais freqüente em casos que não apresentaram ganhos em 1q12-13 e perdas em 3p24 e 3p25.

De maneira semelhante, foi observada associação significativa entre invasão linfática e perda em 12q24.3 ($p=0,010$); casos que apresentaram invasão apresentavam mais freqüentemente a ausência desta perda genômica.

Ganhos em 1q22-q23 ($p=0,024$) e em 6q21 ($p=0,024$) e perdas em 19q13.1 ($p=0,030$) e em 19q13.2 ($p=0,024$) mostraram associação significativa com grau de diferenciação tumoral em CEE. Tumores menos diferenciados foram mais freqüentes entre os casos que apresentaram tais alterações.

Casos com estadiamento mais precoce (I e II) foram mais freqüentes na presença de perdas em 3p25 ($p=0,033$) e em 15q25-q26 ($p=0,020$),

enquanto que estadios mais avançados estavam associados a ausência destas alterações.

Tabela 3 - Associação entre alterações genômicas identificadas por HR-CGH e variáveis clínico-patológicas.

Alteração genômica	Variável		p valor
	Comprometimento linfonodal		
Ganho 1q12-q13	Ausente	Presente	0,041
Ausente (%)	3 (23,1)	10 (76,9)	
Presente(%)	5 (83,3)	1 (16,7)	
Perda 3p24	Ausente	Presente	0,024
Ausente (%)	2 (18,2)	9 (81,8)	
Presente(%)	6 (75,0)	2 (25,0)	
Perda 3p25	Ausente	Presente	0,005
Ausente (%)	3 (21,4)	11 (78,6)	
Presente(%)	5 (100,0)	0 (0)	
Perda 13q31	Ausente	Presente	0,020
Ausente (%)	7 (70,0)	3 (30,0)	
Presente(%)	1 (11,1)	8 (88,9)	
	Grau de diferenciação		
Ganho 1q22-q23	G1+G2	G3+G4	0,024
Ausente (%)	1 (14,3)	6 (85,7)	
Presente(%)	10 (71,4)	4 (28,6)	
Ganho 6q21	G1+G2	G3+G4	0,024
Ausente (%)	4 (30,8)	9 (69,2)	
Presente(%)	7 (87,5)	1 (12,5)	
Perda 19q13.1	G1+G2	G3+G4	0,030
Ausente (%)	2 (22,2)	7 (77,8)	
Presente(%)	9 (75,0)	3 (25,0)	
Perda 19q13.2	G1+G2	G3+G4	0,024
Ausente (%)	1 (14,3)	6 (85,7)	
Presente(%)	10 (71,4)	4 (28,6)	
	Invasão linfática		
Perda 12q24.3	Não observada	Presente	0,010
Ausente (%)	2 (40,0)	3 (60,0)	
Presente(%)	14 (100,0)	0 (0)	
	Estadiamento TNM		
Perda 3p25	I+II	III+IV	0,033
Ausente (%)	5 (33,3)	10 (66,7)	
Presente(%)	5 (100,0)	0 (0)	
Perda 15q25-q26	I+II	III+IV	0,020
Ausente (%)	2 (20,0)	8 (80,0)	
Presente(%)	8 (80,0)	2 (20,0)	

Teste exato de Fisher (p<0,05)

4.3 CGH ARRAY

Para a análise de aCGH, foram avaliadas amostras congeladas de 18 casos de CEE. Destes, quatro casos são procedentes de Erechim (RS) e 14, de São Paulo. O padrão de hibridação em todos os casos foi considerado satisfatório segundo as recomendações do fabricante (Figura 3).

Todos os casos avaliados apresentaram alterações no número de cópias do DNA. No total, foram encontradas 191 alterações genômicas, com uma média de 10,6 alterações para cada caso, sendo que o número encontrado por caso variou de 2 a 35 alterações (Tabela 4). O caso ESOP9 apresentou o maior número de alterações, mostrando 17 regiões envolvidas em ganhos e 18, em perdas genômicas. Em seguida, as amostras ESOP1, ESOP4 e ESOP39 apresentaram somente duas alterações. As amostras ESOP1 e ESOP4 mostraram uma região envolvida em ganho e outra em perda genômica, enquanto que apenas dois ganhos foram observados no caso ESOP39 (Figura 4).

Foi possível observar ganhos e perdas genômicas envolvendo grandes segmentos cromossômicos, incluindo braços e cromossomos inteiros (Figura 5). Ganhos genômicos envolvendo o braço longo do cromossomo 1 foram observados em três dos 18 casos avaliados (ESOP9, ESOP18 e ESOP19). Perdas em 3q foram observadas em dois casos (ESOP8 e ESOP18), e ganhos 3p foram detectados sete casos (ESOP8, ESOP9, ESOP12, ESOP18, ESOP19, ESOP20 e ESOP22). Dois casos (ESOP8 e ESOP9) mostraram perda de todo o cromossomo 4. No

cromossomo 5, os casos ESOP8 e ESOP12 apresentaram perdas de grandes extensões do braço longo. Apenas a amostra ESOP8 mostrou ganho em 7q. Cinco casos (ESOP8, ESOP9, ESOP16, ESOP19, ESOP20) apresentaram ganhos de grandes segmentos genômicos em 8q. Perdas em 9p foram observadas em ESOP8, ESOP9 e ESOP12; enquanto que o caso ESOP18 mostrou ganho em grandes segmentos em 9p e 9q. O caso ESOP18 também mostrou perda de todo o cromossomo 10. Perdas envolvendo o braço curto e o braço longo do cromossomo 11 foram identificadas nos casos ESOP8 e ESOP12, respectivamente. Apenas um caso (ESOP18) apresentou perda de todo o braço longo do cromossomo 13. Foi possível observar ganhos totais ou parciais do braço longo do cromossomo 14, como observado nos casos ESOP9, ESOP15 e ESOP19. Perdas em 18q foram detectados em quatro casos (ESOP8, ESOP9, ESOP12, ESOP16). Ganhos genômicos na mesma região do cromossomo 18 foram identificadas no caso ESOP5. Os casos ESOP8 e ESOP19 mostraram ganhos totais ou parciais de 21q.

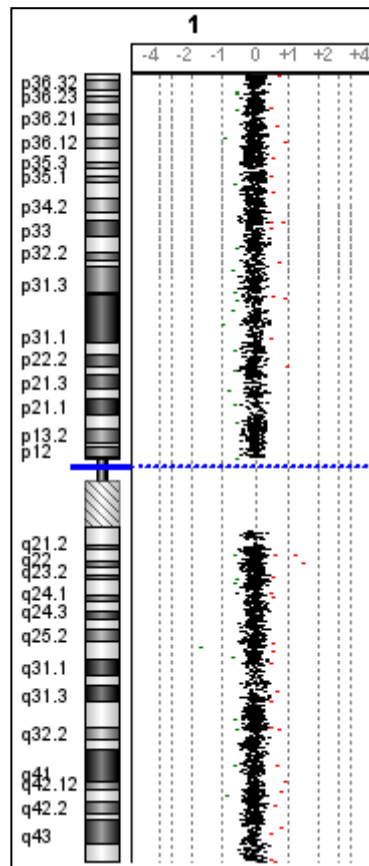


Figura 3 - Exemplo do padrão de perfil de hibridação do cromossomo 1 no caso de CEE ESOP2, avaliado por CGH array.

Tabela 4 - Resumo das alterações genômicas identificadas por CGH *array* em cada caso avaliado.

Caso	No. alterações	GANHOS GENÔMICOS	PERDAS GENÔMICAS
ESOP1	2	10q21.3	14q32.12
ESOP2	6	5p15.33-p11 7q11.23-q22.1; 7q21.3-q22.1 11q13.2-q13.4	9p21.3 14q23.1-q23.2
ESOP4	2	2p22.3	14q32.12
ESOP5	4	13q32.1-q34 18p11.32-p11.2; 18q11.1-q23	2q21.1
ESOP7	9	6q22.31 7p22.3-p22.2; 7q21.3-q22.2 11q13.1-q13.3 16p12.1-p11.2	6p21.33 7q22.1 8q23.2-q23.3 14q32.12
ESOP8	26	3q11.2-q29 6q11.1-q12 7p22.3-p11.2 8q12.2-q24.3 9q22.32 11q21-q22.3; 11q21-q22.1; 11q22.1-q22.3 19p13.11	1q31.3 3p26.3-p12.1; 3q13.31; 3q26.31 4p16.3-p11; 4q11-q35.2 5q11.1-q35.3 6q12-q16.1 7q11.21-q11.2 9p24.3-p13.1; 9q13-q21.33 11p15.5-q11 13q12.11-q21.2 16p13.3-p11.2 18q12.1-q23 19q12-q13.43 21q21.1-q22.3
ESOP9	35	1q21.1-q44 2p24.3-p24.1; 2p24.3 3q25.2-q29 5p15.33-p15.3 8q23.3-q24.3 9p13.3 12q13.13-q13.3; 12q13.13; 12q13.3-q14.1; 12q14.3-q15 14q11.2-q32.33 16q24.3 18p11.32-p11.21; 18q11.2 19p13.2; 19p13.2-p12	1q31.1 2p25.3-p24.3 3q26.31 4p16.3-p11; 4q12-q35.2; 4q12-q21.23; 4q35.1-q35.2 5p13.2-p11; 5q35.2 9p24.3-p13.3; 9p13.2-p13.1 10q23.2-q23.33 12q14.3; 12q21.1-q21.31 14q32.12 18q11.2-q23 19p13.11; 19q13.11

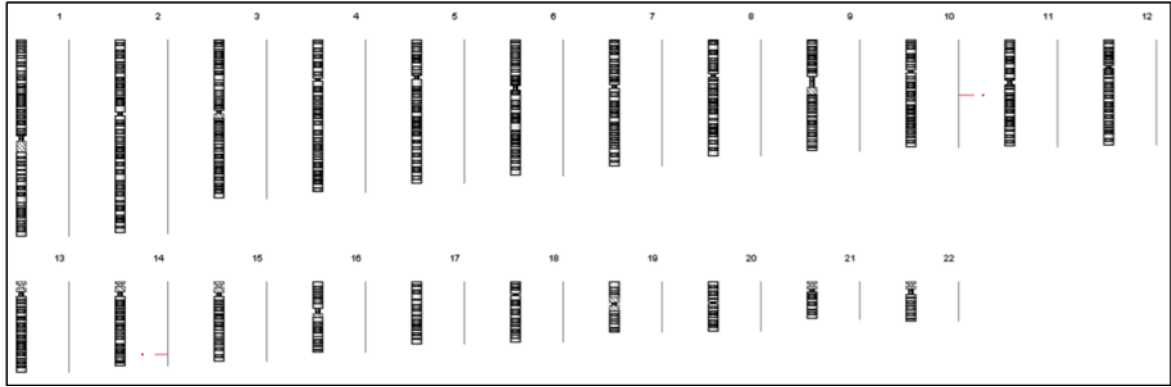
Cont/ Tabela 4

ESOP10	4	4p13 5p15.33 11q13.2-q13.3	17q12
ESOP12	22	3q11.2-q12.2; 3q23-q29 11q13.2; 11q13.2-q13.3	3q26.31 5q14.3-q35.3; 5q31.3 6p21.33 8p23.3-p22; 8q23.2-q23.3 9p24.3-p13.1; 9p22.1-p21.2 10p12.31 11p15.5; 11q13.3-q25 12q24.33 14q11.2; 14q32.12 17p13.3-p11.2 18q11.2-q23 19q13.11 21q22.2-q22.3
ESOP15	7	1p36.33-p36.32 8p12-p11.21 11q13.1-q13.3 14q11.2-q23.1 20p12.2-p12.1	6q23.3 14q32.12
ESOP16	14	1q21.1-q21.3; 1q24.2-q24.3 2q37.3 3q25.1 6p25.2 7q21.11-q31.3 8q22.3-q24.3 11q13.1-q13.4; 11q13.4 14q24.2 16q24.3	7q21.3 8q24.3 10p15.3-p12.33 18q12.1-q23
ESOP18	22	1q21.2-q44 3p12.1; 3q11.2-q29 6q13-q14.1; 6q14.2 8q24.22 9p24.3-p13.1; 9q21.11-q34.2 11q12.3; 11q23.3 19q13.13-q13.2; 19q13.41-q13.43; 19q13.43	3p26.3-p11.2; 3q26.31 10p15.3-p11.21; 10q11.21-q26.3 13q12.11-q34 16p13.3 17p13.3-p11.2 19q13.2-q13.31 21q11.2-q22.3

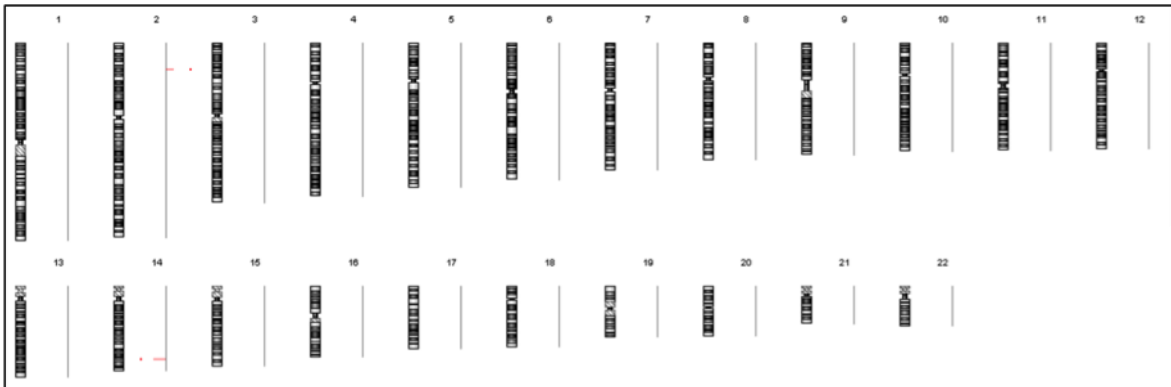
Cont/ Tabela 4

ESOP19	7	1q21.1-q44	
		3q11.2-q29	3q26.31
		8q11.1-q24.3	9p21.3
		14q11.2-q32.33	
		15q21.1-q26.3	
ESOP20	10	3q13.32-q29; 3q26.33-q27.1	
		6q22.32-q22.33	
		8q22.1-q24.3	8q23.2-q23.3
		10p11.22-p11.21	
		11q13.2-q14.2; 11q13.2-q13.4	14q32.12
		21p11.1	
ESOP22	7	3q22.2-q29	3q26.31
		11q12.1-q13.4; 11q13.2-q13.3	
		14q24.2	14q32.12
		20q13.13	
ESOP39	2	11q13.2-q13.3; 11q13.4	
ESOP44	8		3q26.31
			5q23.1; 5q31.3
		6p25.2	
			7q21.13
			8q24.3
			19q13.42
		20p13-p11.21	
ESOP46	4	6p25.2	
		11q13.2-q13.3	
		12q14.2-q15	
		16q24.3	

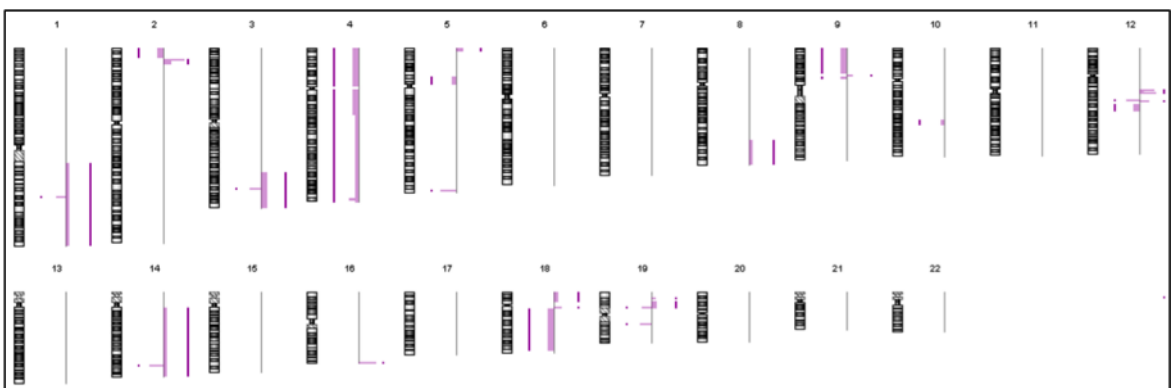
ESOP1



ESOP4



ESOP9



ESOP39

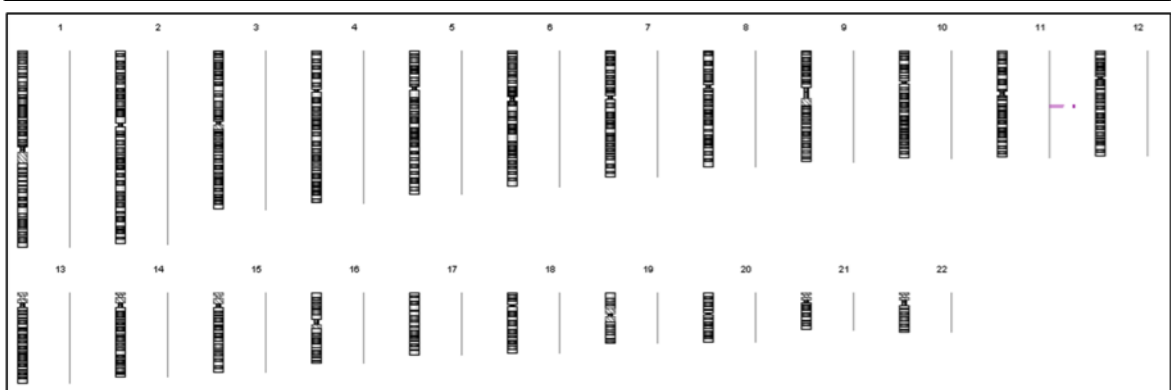


Figura 4 - Ideograma representativo do perfil de alterações genômicas identificadas por CGH array nos casos ESOP1, ESOP4, ESOP9 e ESOP39.

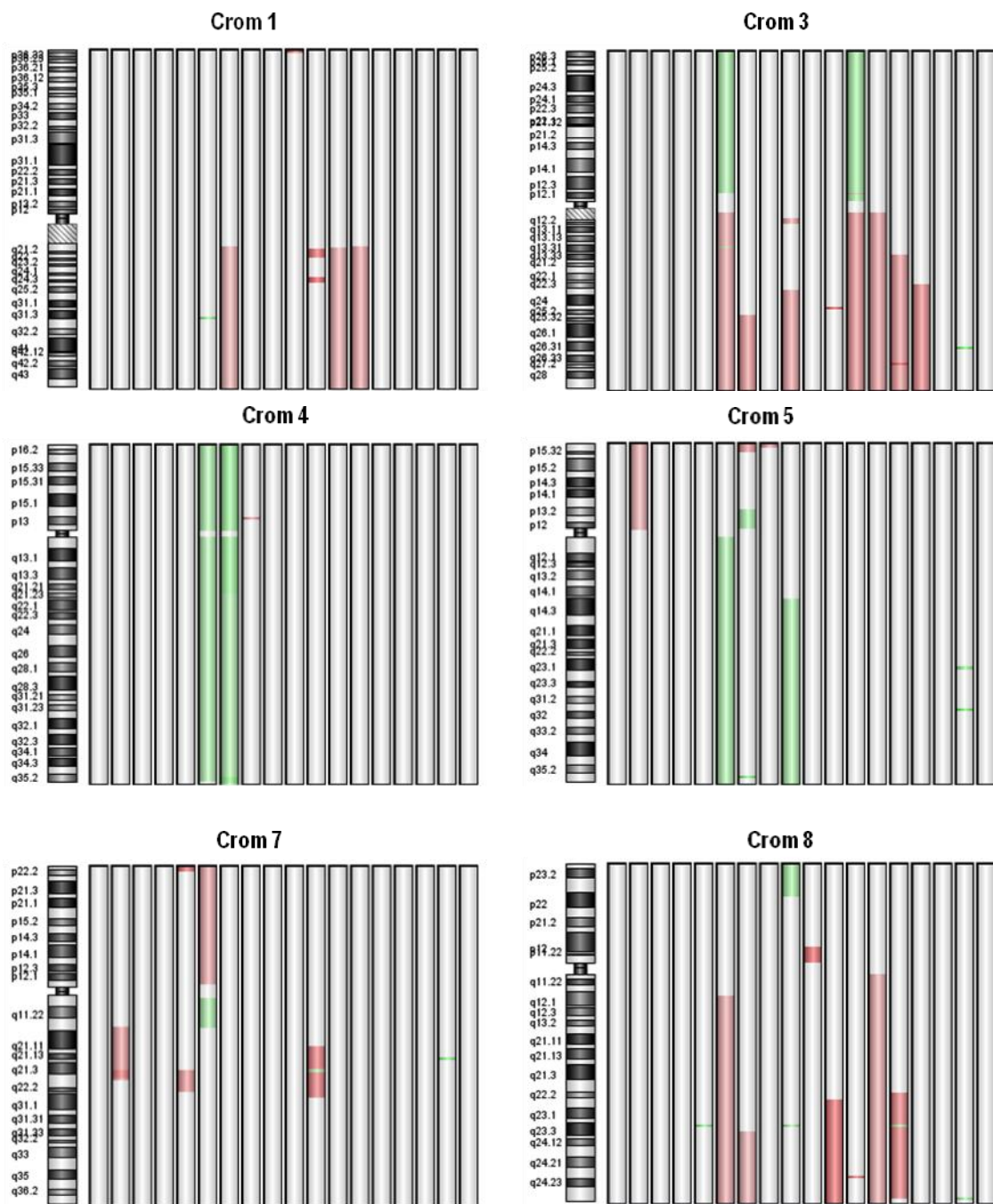
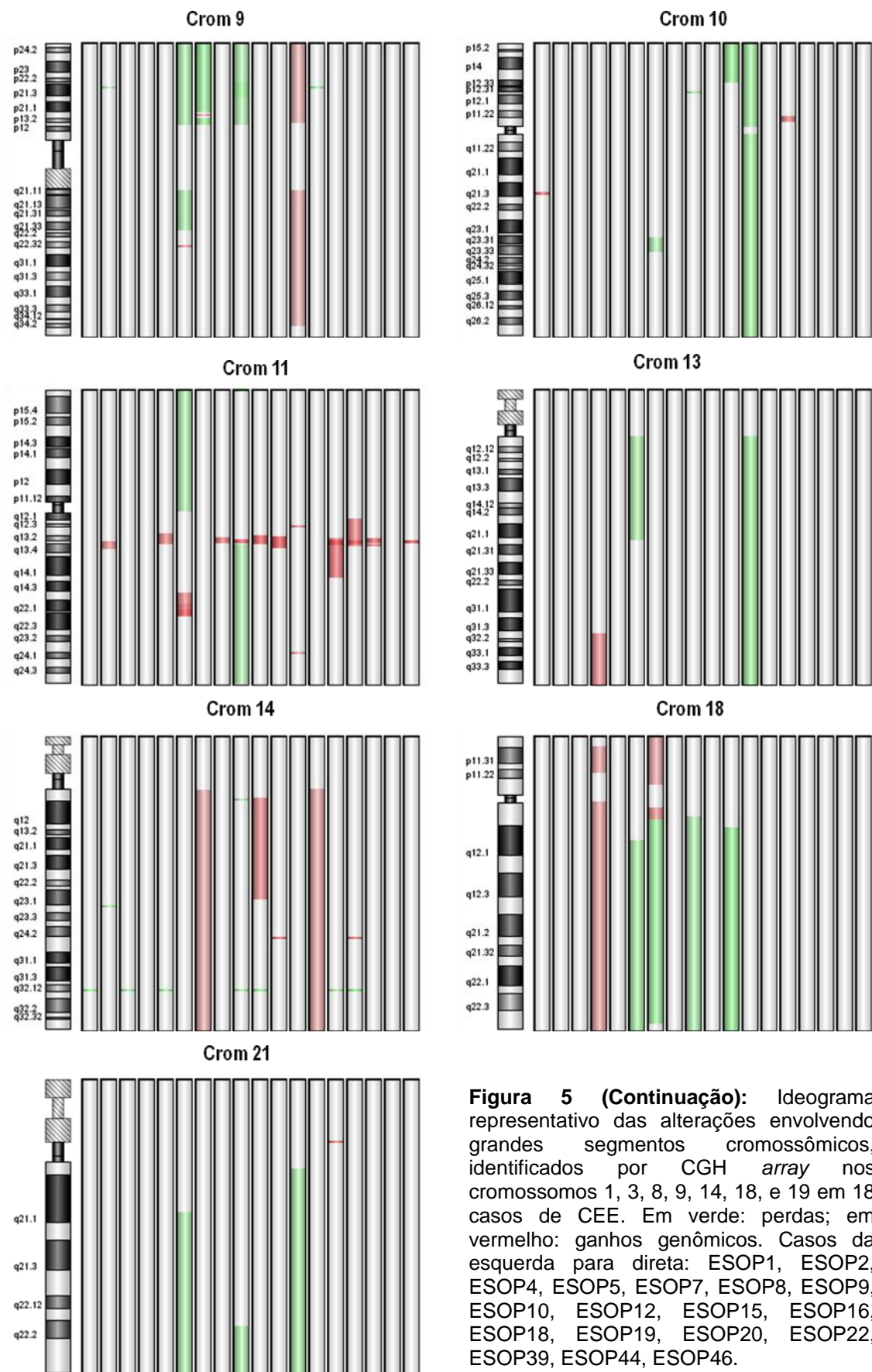


Figura 5 - Ideograma representativo das alterações envolvendo grandes segmentos cromossômicos, identificados por CGH array nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 18, e 21 em 18 casos de CEE. Em verde: perdas; em vermelho: ganhos genômicos. Casos da esquerda para direita: ESOP1, ESOP2, ESOP4, ESOP5, ESOP7, ESOP8, ESOP9, ESOP10, ESOP12, ESOP15, ESOP16, ESOP18, ESOP19, ESOP20, ESOP22, ESOP39, ESOP44, ESOP46.



4.3.1 Regiões mínimas comuns alteradas em CEE identificadas por CGH array

Foram identificadas alterações em regiões mínimas comuns presentes nos 18 casos de CEE avaliados. Para ganhos genômicos, foi considerada a região mínima comum presente em, no mínimo, cinco casos. No caso de perdas genômicas, foram consideradas apenas as regiões mínimas comuns presentes em, pelo menos, três amostras.

Baseado neste critério, foram identificadas 38 alterações genômicas das quais 21 estavam envolvidas em ganhos; e 17, em perdas genômicas (Figura 6). Tais alterações envolvendo ganhos genômicos foram detectadas em 3q, 8q e 11q. Já as perdas genômicas foram encontradas nas regiões 3q, 5q, 8q, 9p, 14q, 18q, 19q e 21q. A relação das regiões alteradas e suas respectivas frequências entre os casos estão apresentadas no Anexo 3.

No cromossomo 3, houve predominância de ganhos no braço longo, nas regiões 3q22.2-q22.3, 3q23-q24, 3q25.1, 3q25.1-q25.2, 3q25.2-q26.31 e 3q26.31-q29. Foi detectada perda genômica envolvendo apenas a região 3q26.31. Foram identificados 273 genes mapeados nas regiões alteradas no cromossomo 3, após a exclusão das CNVs consideradas comuns (presentes no banco de dados DGV, HG18 ou entre os 83 indivíduos brasileiros saudáveis)

As alterações identificadas no cromossomo 5 estavam envolvidas apenas em perdas genômicas nas regiões 5q23.1, 5q31.3 e 5q35.2, sendo mapeados apenas seis genes em tais regiões. Ganhos no cromossomo 8

foram detectadas nas regiões 8q23.3-q24.22, 8q24.22 e 8q24.22-q24.3, onde se mapeiam 86 genes.

Foram observadas apenas perdas genômicas no cromossomo 9 afetando as regiões 9p24.3, 9p24.3-p21.3, 9p21.3-p21.1 e 9p13.3-p13.1. Um total de 97 genes encontra-se mapeado nessas regiões.

As alterações genômicas que apresentaram maiores freqüências entre os casos foram detectadas nos cromossomos 11 e 14. Ganhos no número de cópias do DNA no cromossomo 11 foram identificadas nas regiões 11q13.2, 11q13.2-q13.3, 11q13.3 e 11q13.4, com 24 genes ali mapeados. No cromossomo 14, foi detectada apenas perda genômica em 14q32.12, incluindo apenas um gene.

Foram detectadas três eventos de perdas genômicas no cromossomo 18, afetando as regiões 18q12.1, 18q12.1-q23 e 18q23. Em tais regiões, foram mapeados 156 genes. Perdas nos cromossomos 19 e 21 foram identificadas nas regiões 19q13.11 e 21q22.2-q22.3, respectivamente. Apenas um gene encontra-se mapeado em 19q13.11. No cromossomo 21, foram identificados 83 genes mapeados na região genômica alterada.

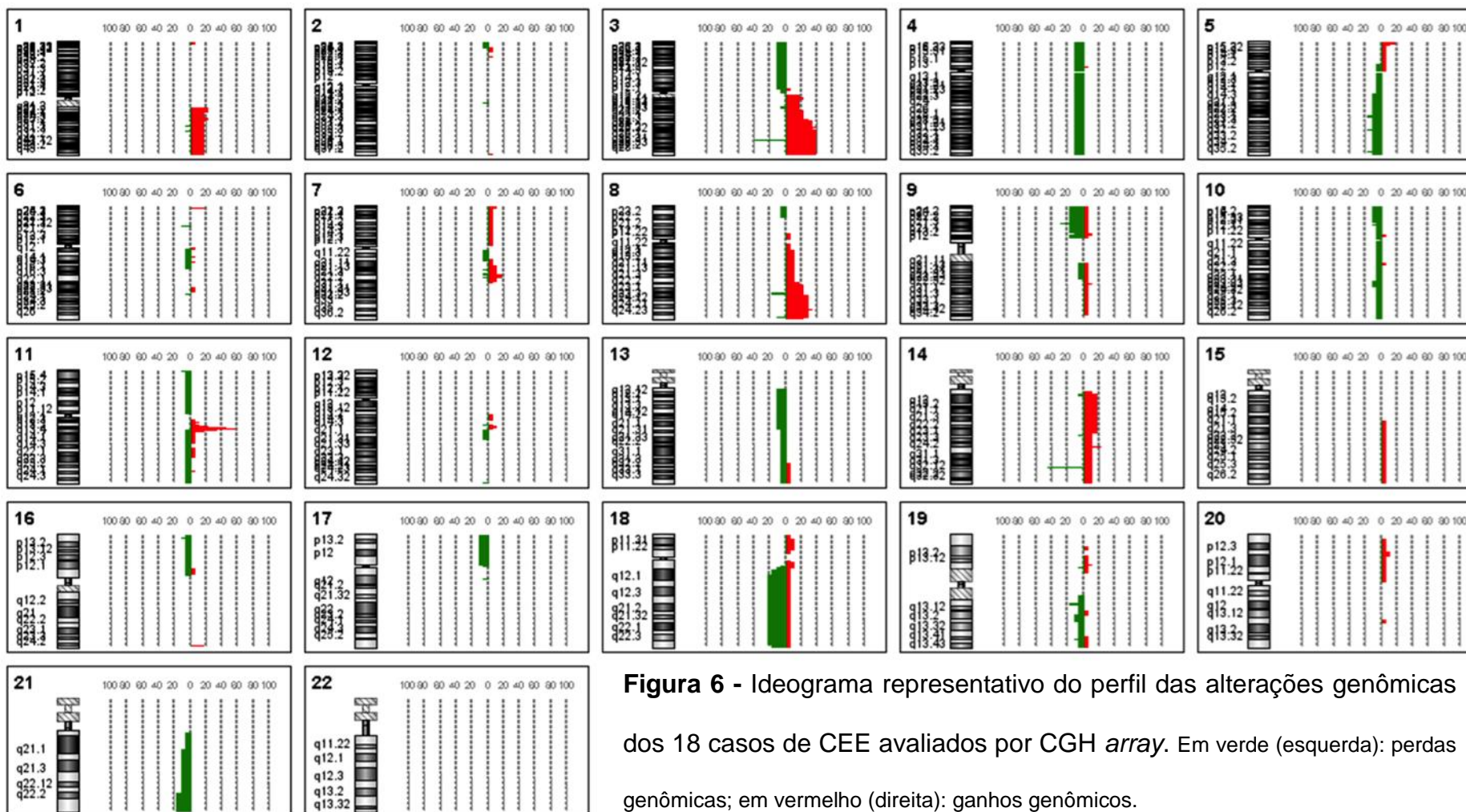


Figura 6 - Ideograma representativo do perfil das alterações genômicas dos 18 casos de CEE avaliados por CGH *array*. Em verde (esquerda): perdas genômicas; em vermelho (direita): ganhos genômicos.

4.3.2 Comparação entre os perfis de alterações genômicas detectadas por CGH array, de acordo com variáveis clínico-patológicas

No presente estudo, foi realizada a comparação entre os perfis de alterações genômicas para verificar a existência de possíveis diferenças de acordo com as variáveis clínico-patológicas. Tais dados encontram-se sumarizados na Tabela 5.

Considerando o grau histológico dos casos de CEE avaliados, números semelhantes de alterações genômicas foram identificados nos casos mais e menos diferenciados (Figura 7). Casos bem (G1) e moderadamente diferenciados (G2) apresentaram o total de 99 alterações, enquanto que casos menos diferenciados (G3 e G4) mostraram 92 alterações genômicas, com predominância de ganhos genômicos.

De acordo com nível de infiltração tumoral, casos que apresentaram invasão da camada adventícia mostraram o total de 113 alterações, o mais elevado quando comparado a infiltração da camada basal e muscular (Figura 8). Em tais casos, foi possível observar que perdas genômicas foram as mais freqüentemente observadas.

Casos em que não foi constatada a presença de invasão venosa apresentaram 176 alterações, enquanto que foram identificadas apenas 15 alterações em amostras com presença de invasão venosa (Figura 9).

O total de 115 alterações genômicas foi detectado em casos com metástase linfonodal; casos em que não houve comprometimento linfonodal apresentaram 76 alterações (Figura 10).

Casos em estadios mais avançados (III e IV) apresentaram 112 alterações, sendo que 56,3% dessas alterações estavam envolvidas em perdas genômicas (Figura 11). Em contrapartida, foram detectadas 76 alterações em casos em estadios mais precoces (I e II).

De acordo com a evolução da doença, o total de 99 alterações foi encontrado em casos que morreram devido ao câncer. Os casos que continuam vivos, com ou sem a doença, apresentaram 92 alterações genômicas. Apesar da semelhança entre o número total de alterações detectadas em casos pertencentes às duas categorias, aqueles que morreram devido ao câncer apresentaram média de 14,1 alterações/caso, enquanto que casos que permanecem vivos mostraram média de 8,7 alterações/caso (Figura 12).

Apesar de algumas diferenças terem sido encontradas entre o número total de alterações detectadas em casos de CEE de acordo com as variáveis clínico-patológicas acima mencionadas, nenhuma associação significativa foi encontrada com as regiões envolvidas em alterações genômicas.

Ganhos em 11q13.3 foi significativamente associado a invasão linfática ($p=0,022$). Embora o número de alterações genômicas detectadas em casos que não apresentaram invasão linfática tenha sido superior quando comparado ao observado em casos com presença de invasão (Figura 13), a presença de comprometimento vascular linfático foi mais freqüente em amostras com ganhos em 11q13.3 (Tabela 5).

Tabela 5 - Sumários dos dados resultantes da comparação entre o perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH em casos de CEE, de acordo com variáveis clínico-patológicas.

Variável	No. de casos (%)	Total de alterações	Média/caso	Ganho	Perda
Grau histológico					
G1+G2	10 (55,6)	99	9,9	47	52
G3+G4	8 (44,4)	92	11,5	54	38
Nível de infiltração					
Camada basal	3 (16,7)	31	10,3	20	11
Muscular	7 (38,9)	47	6,7	31	16
Adventícia	8 (44,4)	113	14,1	50	63
Invasão venosa					
Não observada	16 (88,9)	176	11,0	92	84
Presente	2 (11,1)	15	7,5	9	6
Invasão linfática					
Não observada	13 (72,2)	126	9,7	65	61
Presente	5 (27,8)	65	13,0	36	29
Comprometimento linfonodal					
Negativo	9 (50,0)	76	8,4	36	40
Presente	9 (50,0)	115	12,8	65	50
Estadiamento					
I+II	9 (50,0)	79	8,8	38	41
III+IV	9 (50,0)	112	12,4	63	49
Evolução da doença					
Morte por câncer	7 (38,9)	99	14,1	52	47
Vivos	11 (61,1)	92	8,4	49	43

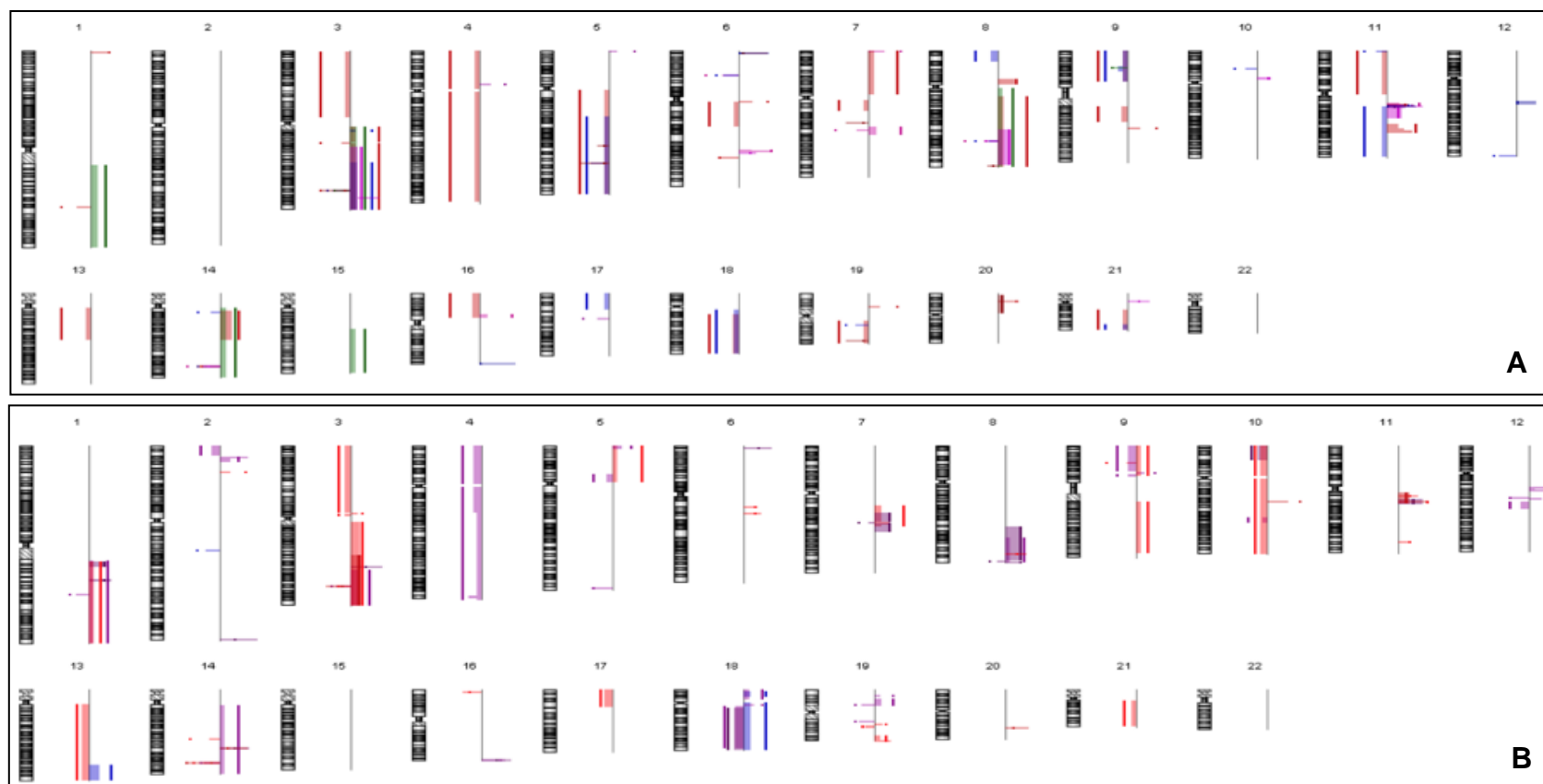


Figura 7 - Ideogramas representativos dos perfis de alterações genômicas detectadas por aCGH, em casos de CEE de acordo com o grau de diferenciação tumoral. (A) Perfil de alterações de casos considerados bem (G1) e moderadamente diferenciados (G2). (B) Perfil de alterações de casos classificados como pouco diferenciados (G3) e indiferenciados (G4).

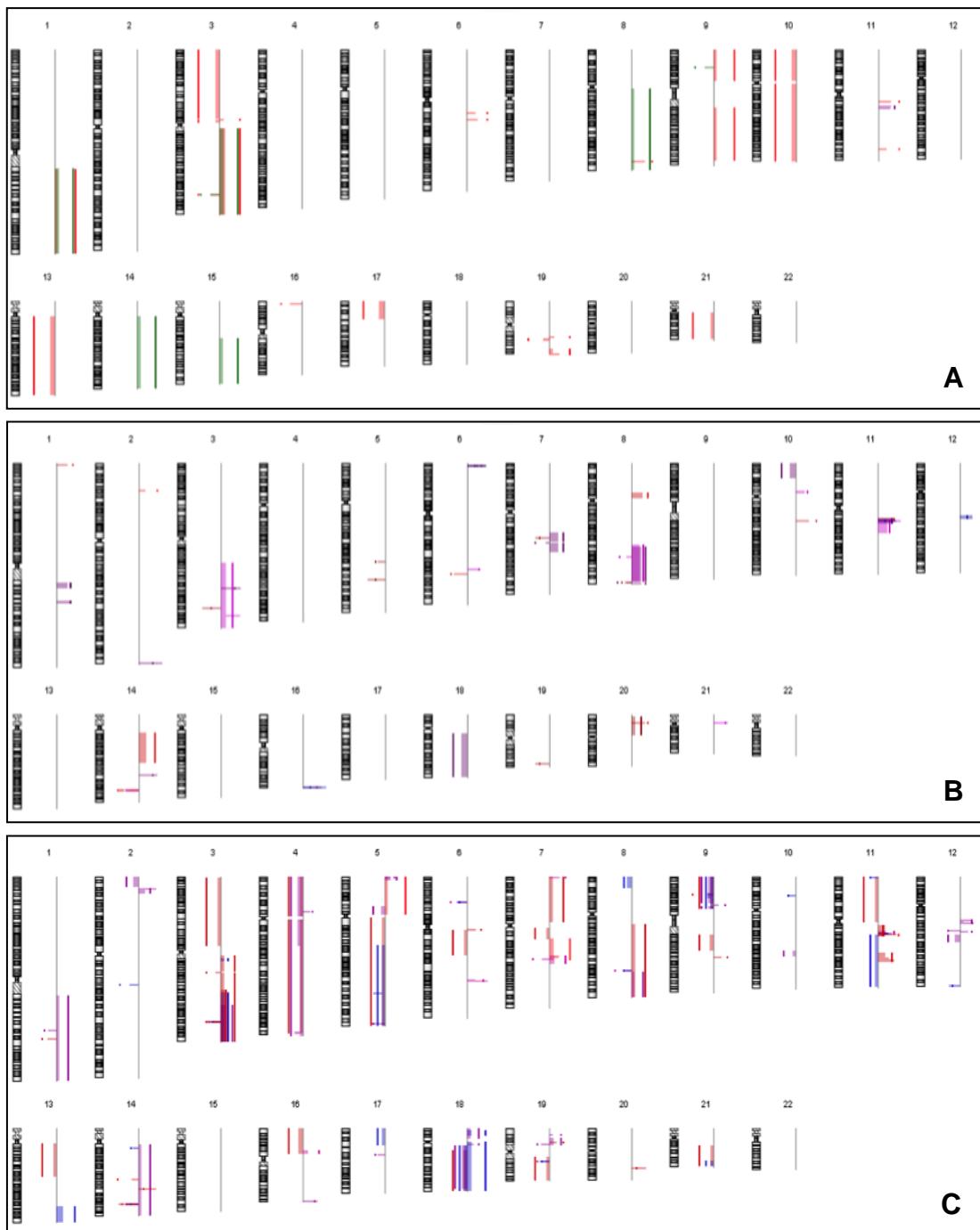


Figura 8 - Ideogramas representativos do perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH em casos de CEE, baseado no nível de infiltração tumoral. **(A)** Casos que apresentaram infiltração até camada basal; **(B)** Amostras que mostraram infiltração até camada muscular e **(C)** Casos que apresentaram infiltração até a camada adventícia.

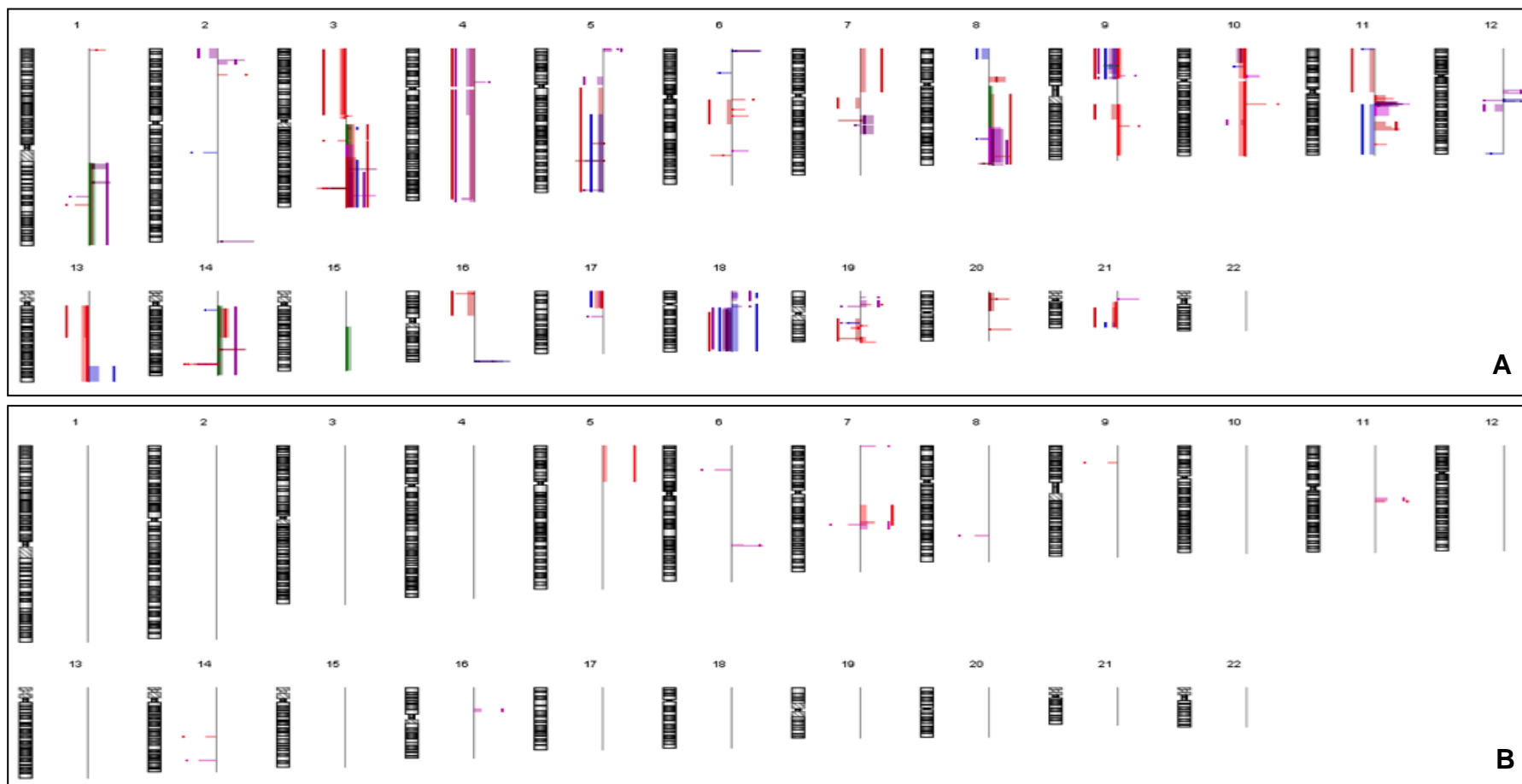


Figura 9 - Ideogramas representativos do perfil de alterações genômicas identificadas por aCGH em casos de CEE, de acordo com invasão venosa. (A) Alterações genômicas em casos que não apresentaram invasão venosa; (B) Perfil de alterações em casos com invasão venosa.

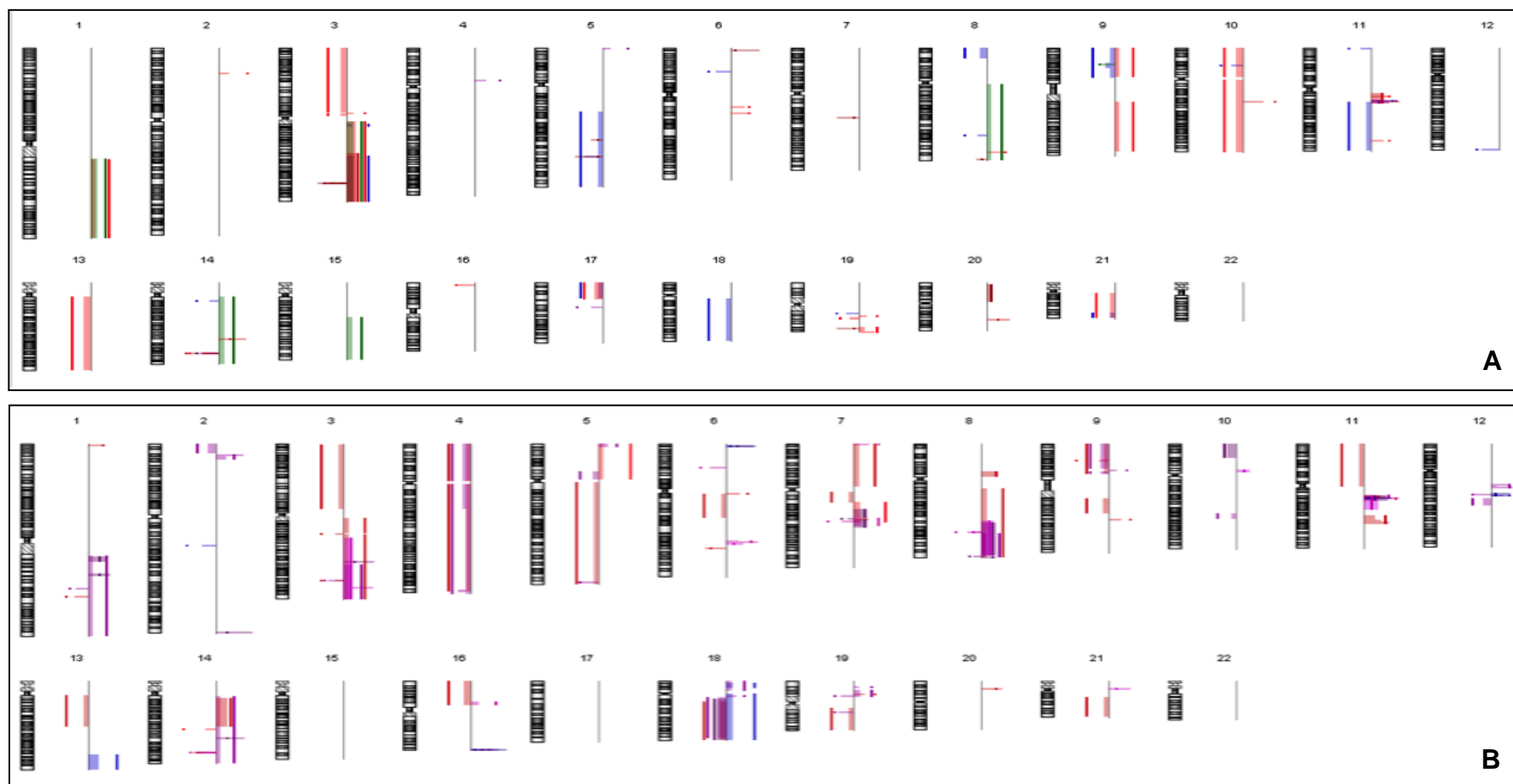


Figura 10 - Ideogramas representativos do perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH, em casos de CEE de acordo com a presença de metástase linfonodal. (A) Perfil de alterações de casos sem comprometimento linfonodal e (B) com comprometimento linfonodal.

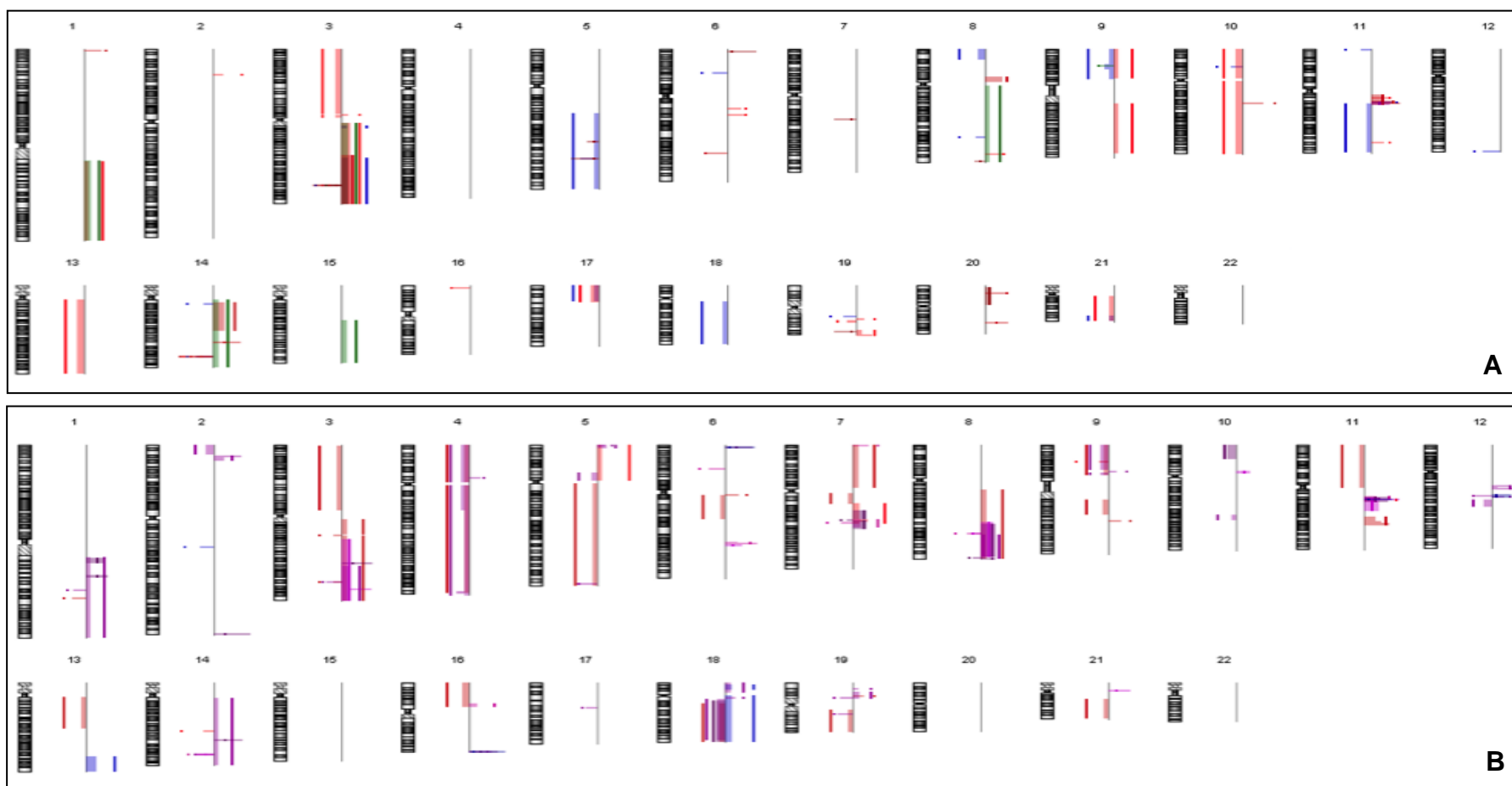


Figura 11 - Ideogramas representativos do perfil de alterações genômicas identificados por aCGH, em casos de CEE, de acordo com o estadiamento tumoral. (A) Alterações de casos com estadiamento mais precoce (I e II) e (B) perfil de alterações de casos com estadiamento mais avançados (III e IV).

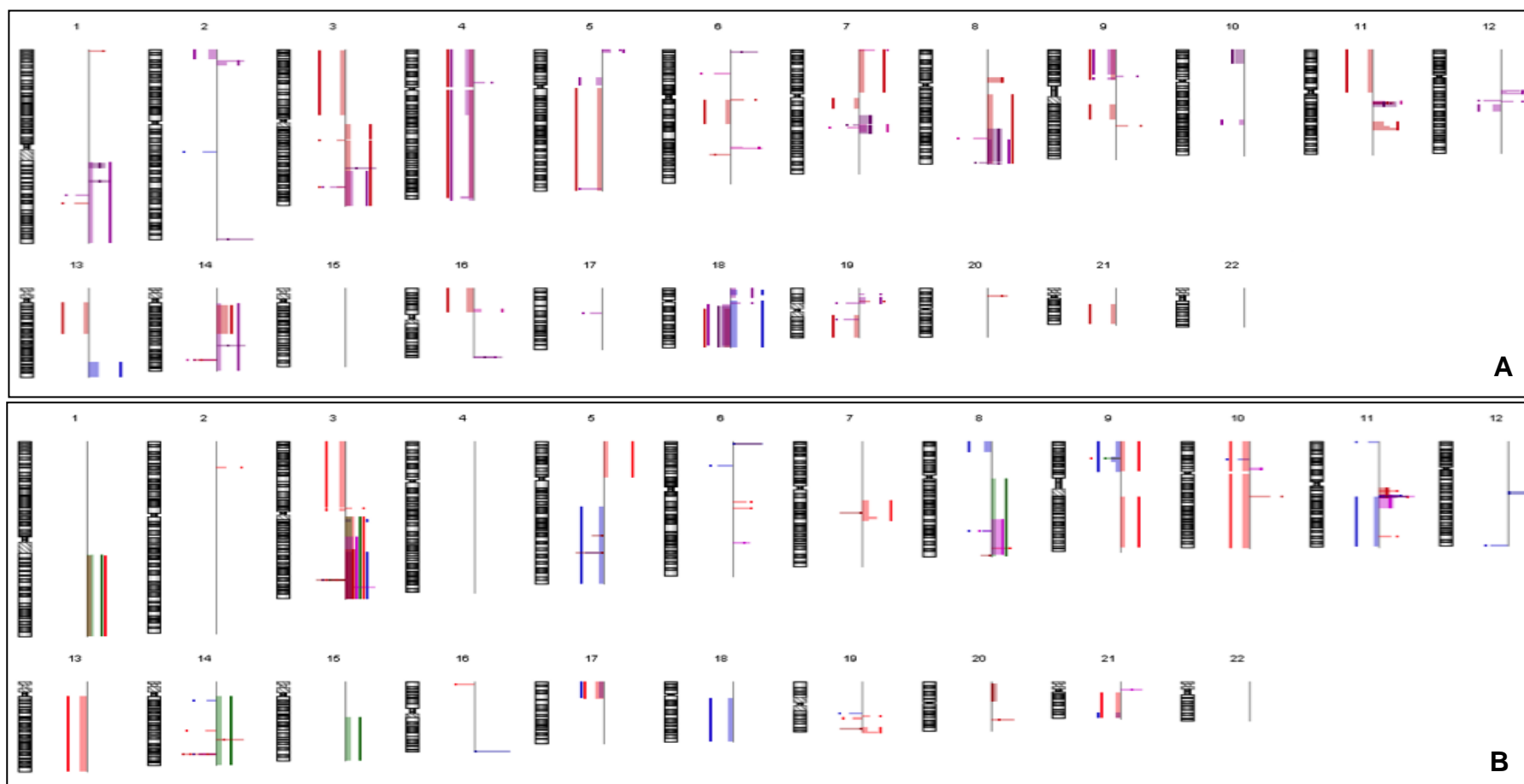


Figura 12 - Ideogramas representativos do perfil de alterações genômicas, detectadas por aCGH, em casos de CEE de acordo com evolução da doença. (A) Perfil de alterações em casos que morreram devido ao câncer e (B) em casos que continuam vivos, com ou sem doença.

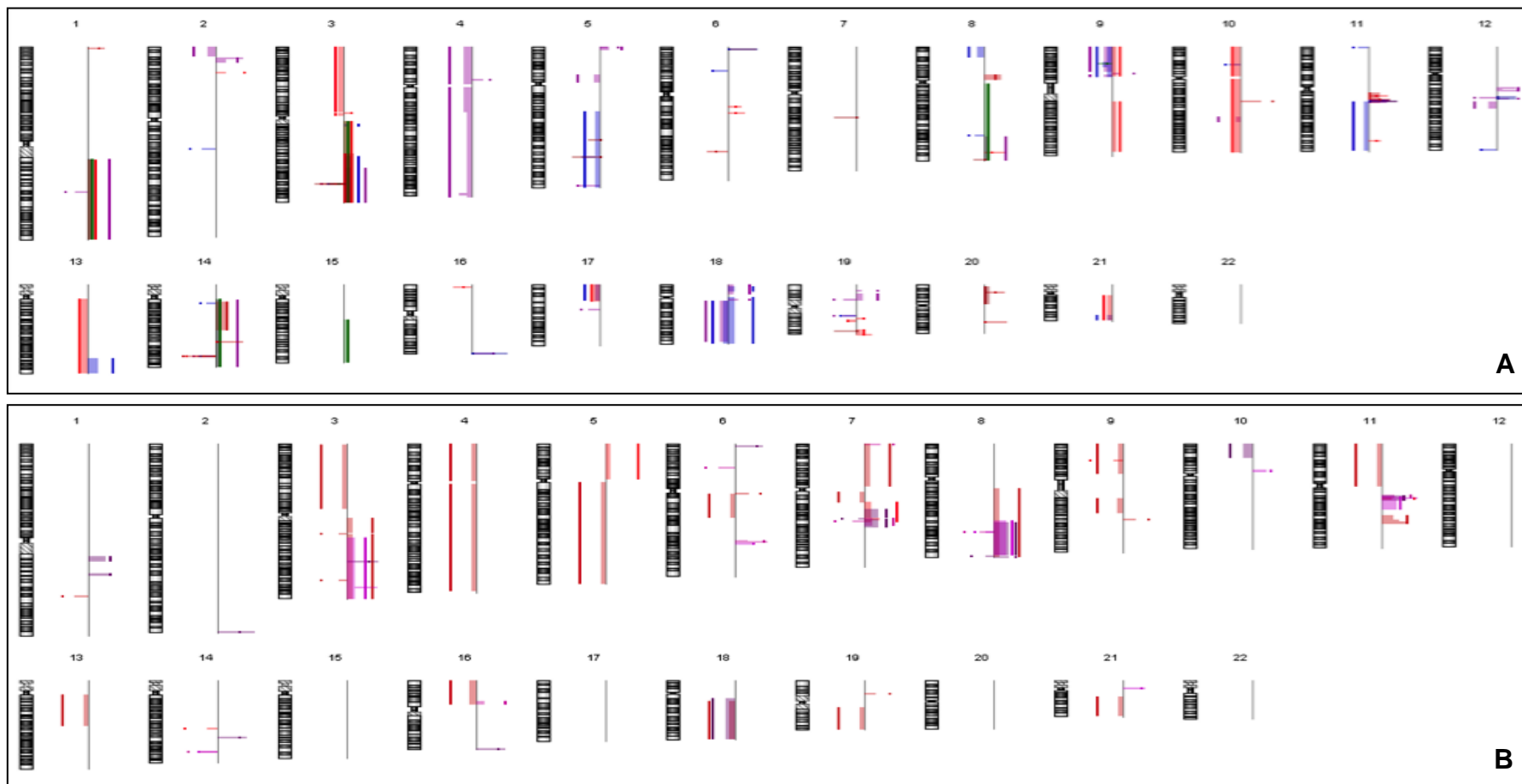


Figura 13 - Ideogramas representativos do perfil de alterações genômicas identificadas por aCGH de casos de CEE, de acordo com invasão linfática. (A) Perfil dos casos que não apresentaram invasão linfática e (B) casos com presença de invasão linfática.

Tabela 6 - Associação entre alterações genômicas identificadas por aCGH e fatores clínico-patológicos em CEE.

Variável	Alteração Genômica		p valor
	Ganho 11q13.32		
Invasão Linfática	Ausente (%)	Presente (%)	0,022
Não observado	11 (91,7)	2 (33,3)	
Presente	20 (8,3)	4 (66,7)	

4.3.3 Comparação entre os achados de CGH *array* e HR-CGH

Foi realizada a comparação entre os achados resultantes das análises de aCGH e de HR-CGH somente nos nove casos pareados (ESOP1, ESOP2, ESOP4, ESOP5, ESOP7, ESOP8, ESOP9, ESOP12 e ESOP15) que foram submetidos as duas técnicas. Para HR-CGH, foram utilizadas amostras em FFEP e para aCGH, amostras a fresco. As amostras utilizadas para o primeiro procedimento passaram por amplificação baseada no método de PCR (PCR-SCOMP, descrito em detalhes em Material e Métodos).

Para essa comparação, os dados de aCGH foram gerados utilizando dois diferentes *thresholds*, um mais restritivo de 6.0 (dados já apresentados no item 4.3) e outro, de 5.0.

No total, o número de alterações genômicas detectadas pela técnica de aCGH foi menor do que o observado por HR-CGH. Foram detectadas 409 aberrações cromossômicas por HR-CGH; pela metodologia de aCGH, considerando o *threshold* de 6.0, foram identificadas 113 alterações genômicas, após a exclusão das CNVs comuns. A porcentagem de concordância entre as alterações detectadas pelas duas metodologias variou de 0 a 50% para cada caso. A maior porcentagem de concordância (50%) das alterações identificadas por aCGH foi apresentada para os casos ESOP1, ESOP2 e ESOP4. Das duas alterações genômicas detectadas por aCGH para ESOP1 e ESOP4, apenas a perda em 14q32.12 foi também identificada por HR-CGH em ambos os casos. Em ESOP2, ganhos em 7q21.3-q22.1 e em 11q13.2-q13.4 e perdas genômicas em 14q23.1-q23.2

estão em concordância com os achados de HR-CGH. Por outro lado, nenhuma concordância foi encontrada entre as alterações identificadas por HR-CGH e aCGH na amostra ESOP15. Tais dados estão sumarizados na Tabela 7.

Em uma segunda análise comparativa, considerando apenas as alterações mais frequentes em regiões mínimas comuns detectadas pelas duas metodologias, foi observada uma concordância de 66,7% e 77,7% para ganhos e perdas genômicas, respectivamente, de um total de 15 alterações. Os ganhos envolvendo as regiões 11q13.2, 11q13.2-q13.3 e 11q13.3 e perdas em 5q35.2, 9p24.3-p21.3, 9p21.3, 9p21.3-p21.1, 9p13.3-p13.1, 14q32.12 e em 19q13.11 foram detectadas tanto por aCGH quanto por HR-CGH nos nove casos pareados (Tabela 8).

Utilizando o *threshold* de 5.0, foram detectadas um total de 233 alterações genômicas pela técnica de aCGH (Tabela 9). O número de alterações variou de 8 a 56 em cada caso, com uma média de 24 alterações por caso. Considerando as regiões envolvidas em ganhos e perdas genômicas identificadas por aCGH, foi constatada porcentagem de concordância com as alterações detectadas por HR-CGH variando de 8,3 a 50%. O caso ESOP2 apresentou a maior porcentagem de concordância, 50%, em que ganhos nas regiões 7q21.3-q22.1 e 11q13.2-q13.4 e perdas em 14q23.1-q23.2 e 22q13.1 também foram detectadas pela técnica de HR-CGH. A menor porcentagem de concordância (8,3%) foi apresentada por ESOP7; das 24 alterações detectadas por aCGH, apenas o ganho em

11q13.1-q13.3 e perda em 3q26.31 foram encontradas por HR-CGH nos nove casos pareados.

Levando em consideração as alterações em regiões mínimas comuns detectadas por aCGH, foi observado que 35,3% dos ganhos genômicos detectados por aCGH (11q13.2 e 11q13.3) foram concordantes com as regiões envolvidas em ganhos identificadas por HR-CGH (Tabela 10). Entre as perdas genômicas, foi constatado que 47% das alterações (5q35.2, 9p22-p21.3, 9p21.3, 9p21.3-p21.1, 9p13.2-p13.1, 9q34.2, 14q32.12, 18q11.2-q12, 18q21-q23, 19p13.11, 19q13.11 e 19q13.32) também foram detectadas por HR-CGH.

Tabela 7 - Regiões cromossômicas alteradas em cada caso de CEE, detectadas por aCGH utilizando o *threshold* de 6.0, que foram concordantes com os dados obtidos por HR-CGH. Apenas dados resultantes da análise dos nove casos pareados que foram submetidos as duas metodologias foram comparados.

CGH array (threshold 6.0)				
Caso	No. alterações	GANHOS GENÔMICOS	PERDAS GENÔMICAS	Concordância Global
ESOP1	2		14q32.12	50,0%
ESOP2	6	7q21.3-q22.1 11q13.2-q13.4	14q23.1-q23.2	50,0%
ESOP4	2		14q32.12	50,0%
ESOP5	4	13q34		25,0%
ESOP7	9	11q13.1-q13.3		11,1%
ESOP8	26	3q26.3-q29	4p15.3-p15.1 5q23; 5q34 9p23-p21 16p12 18q12; 18q23 19q13.2-q13.3	34,6%
ESOP9	35	19p13.1	1q31.1 9p22-p13.3; 9p13.2-p13.1	11,4%
ESOP12	22		8p22 9p21-p13.1; 9p21.1-p21.2 10p12.31 11p15.5; 11q23-q24 12q24.33 18q21-q23 19q13.11 21q22.2-q22.3	45,5%
ESOP15	7			0

Tabela 8 - Alterações em regiões mínimas comuns, detectadas por aCGH (*threshold* 6.0) nos nove casos pareados que foram submetidos as duas metodologias: HR-CGH e aCGH. Em negrito, estão indicadas as regiões cromossômicas alteradas que foram consistentes com dados de HR-CGH.

CGH array (<i>threshold</i> 6.0)		
GANHOS GENÔMICOS		
Região	Casos	Concordância
3q25.2-q26.31	ESOP9, ESOP8, ESOP12	66,7%
3q26.31-q29	ESOP9, ESOP8, ESOP12	
11q13.2	ESOP12, ESOP15, ESOP7	
11q13.2	ESOP12, ESOP15, ESOP7	
11q13.2-q13.3	ESOP12, ESOP15, ESOP7, ESOP2	
11q13.3	ESOP15, ESOP7, ESOP2	
PERDAS GENÔMICAS		
Região	Casos	Concordância
3q26.31	ESOP9, ESOP12, ESOP8	77,7%
5q35.2	ESOP9, ESOP12, ESOP8	
9p23-p21.3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	
9p21.3	ESOP9, ESOP12, ESOP2, ESOP8	
9p21.3-p21.1	ESOP9, ESOP12, ESOP8	
9p13.3-p13.1	ESOP9, ESOP12, ESOP8	
	ESOP7, ESOP15, ESOP9, ESOP4,	
14q32.12	ESOP12, ESOP1	
18q12.1-q23	ESOP9, ESOP12, ESOP8	
19q13.11	ESOP9, ESOP12, ESOP8	

Tabela 9 - Regiões cromossômicas alteradas em cada caso de CEE, detectadas por aCGH utilizando o *threshold* de 5.0, que foram concordantes com os dados obtidos por HR-CGH. Apenas dados resultantes da análise dos nove casos pareados que foram submetidos as duas metodologias foram comparados.

CGH array (threshold 5.0)				
Caso	No. alterações	Ganhos Genômicos	Perdas Genômicas	Concordância Global
ESOP1	11		8q23.2 - q23.3 14q32.12 16p12.3 19p13.3; 19q13.32	45,5%
ESOP2	8	7q21.3 - q22.1 11q13.2 - q13.4	14q23.1 - q23.2 22q13.1	50,0%
ESOP4	12		1p31.1 9q34.3 14q11.2; 14q32.12	33,0%
ESOP5	26	3p21.31 13q34	8p22 - p12; 8p23.3 17p13.1; 17q23.2 20q11.23 - q13.1; 20q13.32 - q13.1	30,7%
ESOP7	24	11q13.1 - q13.3	3q26.31	8,3%
ESOP8	38	3q26.3 - q29	4p15.3 - p15.1 5q23; 5q34 9p23 - p21; 9p21.3 16p12; 16p12.3 18q12.1; 18q23 19q13.2 - q13.3	28,9%
ESOP9	56	16p13.3 19p13.1	1q21.2; 1q31.1 9p22 - p13.3; 9p13.2 - p13.1	10,7%

Cont/ Tabela 9

ESOP12	42	1p22.2 - p22.1		40,5%
			8p23.3 - p22; 8q24.3 9p21 - p13.1; 9p21.2; 9q34.3 10p12.31 11p15.5 12q14.1 12q24.33 13q21.2 16p13.3; 16p11.2 18q21 - q23 19p13.3; 19p13.11 21q22.2 - q22.3	
ESOP15	16	5p15.33	5q33.3 10p12.31 19q13.11	31,2%
		21q22.11		

Tabela 10 - Alterações em regiões mínimas comuns, detectadas por aCGH (*threshold* 5.0) nos nove casos pareados que foram submetidos as duas metodologias: HR-CGH e aCGH. Em negrito, estão indicadas as regiões cromossômicas alteradas que foram consistentes com dados de HR-CGH.

CGH array (<i>threshold</i> 5.0)			
GANHOS GENÔMICOS			
Região	Casos	Concordância	
3q25.2-q26.31	ESOP9, ESOP8, ESOP12	35,29%	
3q26.31-q27.1	ESOP9, ESOP8, ESOP12		
3q27.1-q27.3	ESOP9, ESOP8, ESOP12, ESOP5		
3q27.3	ESOP9, ESOP8, ESOP12		
3q27.3	ESOP9, ESOP8, ESOP12		
5p15.33-p15.32	ESOP9, ESOP15, ESOP2		
8q23.3-q24.3	ESOP9, ESOP8, ESOP5		
8q24.3	ESOP9, ESOP8, ESOP5		
11q13.2	ESOP8, ESOP15, ESOP7		
11q13.2	ESOP8, ESOP12, ESOP15, ESOP7		
11q13.2	ESOP8, ESOP15, ESOP7		
11q13.2	ESOP8, ESOP12, ESOP15, ESOP7		
11q13.3	ESOP8, ESOP12, ESOP15, ESOP7, ESOP2		
11q13.3	ESOP8, ESOP15, ESOP7, ESOP2		
14q11.2	ESOP1, ESOP9, ESOP15		
14q11.2	ESOP9, ESOP1, ESOP15		
14q11.2	ESOP1, ESOP9, ESOP15		
PERDAS GENÔMICAS			
Região	Casos		Concordância
1q21.2	ESOP7, ESOP9, ESOP12	47,8%	
3q26.31	ESOP7, ESOP9, ESOP12, ESOP8		
5q31.3	ESOP7, ESOP9, ESOP12, ESOP8		
5q33.2	ESOP15, ESOP12, ESOP8		
5q35.2	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
6q23.2	ESOP7, ESOP9, ESOP12		
6q23.2	ESOP7, ESOP15, ESOP9, ESOP12		
6q23.2	ESOP15, ESOP9, ESOP12		
8q23.3	ESOP7, ESOP9, ESOP4, ESOP12, ESOP1		
9p24.3-p21.3	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
9p21.3	ESOP9, ESOP12, ESOP2, ESOP8		
9p21.3-p21.1	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
9p13.2-p13.1	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
9q34.2	ESOP9, ESOP4, ESOP12		
10p12.31	ESOP15, ESOP9, ESOP4, ESOP12		
10q23.33	ESOP9, ESOP4, ESOP12		
14q11.2	ESOP15, ESOP9, ESOP4, ESOP12, ESOP1		
14q32.12	ESOP7, ESOP15, ESOP9, ESOP4, ESOP12, ESOP1		
18q12.1-q23	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
19p13.11	ESOP7, ESOP9, ESOP12		
19q13.11	ESOP7, ESOP15, ESOP9, ESOP4, ESOP12, ESOP8		
19q13.32	ESOP7, ESOP1, ESOP8		
19q13.42	ESOP7, ESOP15, ESOP8		

4.3.4 Genes de interesse

Foram identificados 727 genes candidatos mapeados nas regiões mínimas comuns contendo alterações genômicas detectadas por aCGH. Os genes associados a CNVs previamente descritas foram descartadas da análise (Anexo 3).

Dentre as regiões mais freqüentemente alteradas, foram identificados alguns genes de interesse. Os genes encontrados estão envolvidos em diversos mecanismos como controle do ciclo celular, fatores de crescimento, adesão celular, fatores de transcrição, regulação da apoptose, entre outros. Como exemplo, podemos citar alguns genes conhecidos por seu envolvimento em câncer. Devido ao elevado número de genes envolvidos nas alterações detectadas por aCGH, apenas alguns deles serão mencionados no presente estudo.

Ganhos em 11q foram as mais freqüentes entre os casos avaliados, destacando-se as regiões 11q13.2, 11q13.2-q13.3 e 11q13.3, em cerca de 50% dos casos (Figura 14). Tais regiões também foram detectadas pela técnica de HR-CGH em 61,9% dos casos. Vinte e oito genes foram mapeados em tais regiões, incluindo alguns que atuam no controle do ciclo celular como *CCND1* (Figura 15), fatores de crescimento do fibroblasto como *FGF19*, *FGF4* e *FGF3* (Figura 16) e adesão celular como *CTTN* (Figura 17).

Genes envolvidos em adesão celular encontram-se mapeados nas regiões envolvidas em perdas genômicas no cromossomo 18, apesar da baixa freqüência entre os casos avaliados, como os membros do grupo das caderinas *CDH2* em 18q12.1 (Figura 18), *CDH7* e *CDH19* em 18q22.1

(Figura 19) e *CDH20* em 18q21.3 (Figura 20). Adicionalmente, na região 18q12.1, também podem ser encontrados genes das subfamílias desmogleína (*DSG1*, *DSG2*, *DSG3* e *DSG4*) e desmocolina (*DSC1*, *DSC2* e *DSC3*) pertencentes a superfamília de caderinas desmossomais (Figuras 21 e 22).

Genes envolvidos na via de sinalização Wnt também foram identificados em regiões que se encontraram alteradas no presente estudo. Entre tais genes, foram identificados a fosfoproteína *DVL3* em 3q27.1 (Figura 23), o co-receptor *LRP5* em 11q13.2 (Figura 24).

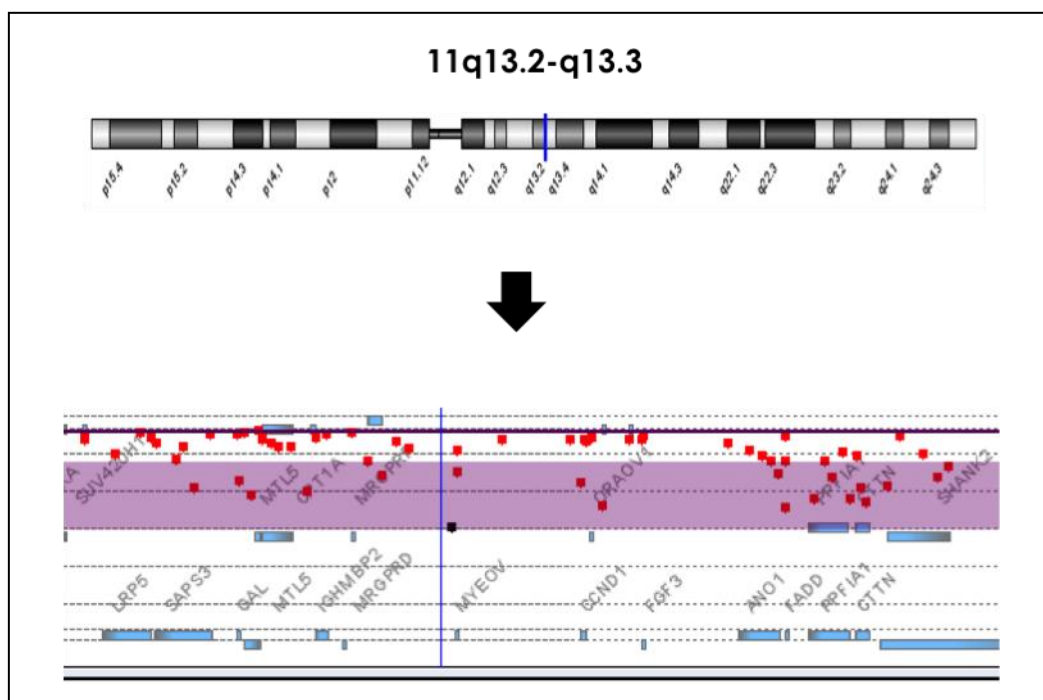


Figura 14 - Representação dos genes que se encontram mapeados nas regiões envolvidas em ganhos genômicos 11q13.2-q13.3, detectadas por aCGH em CEE.

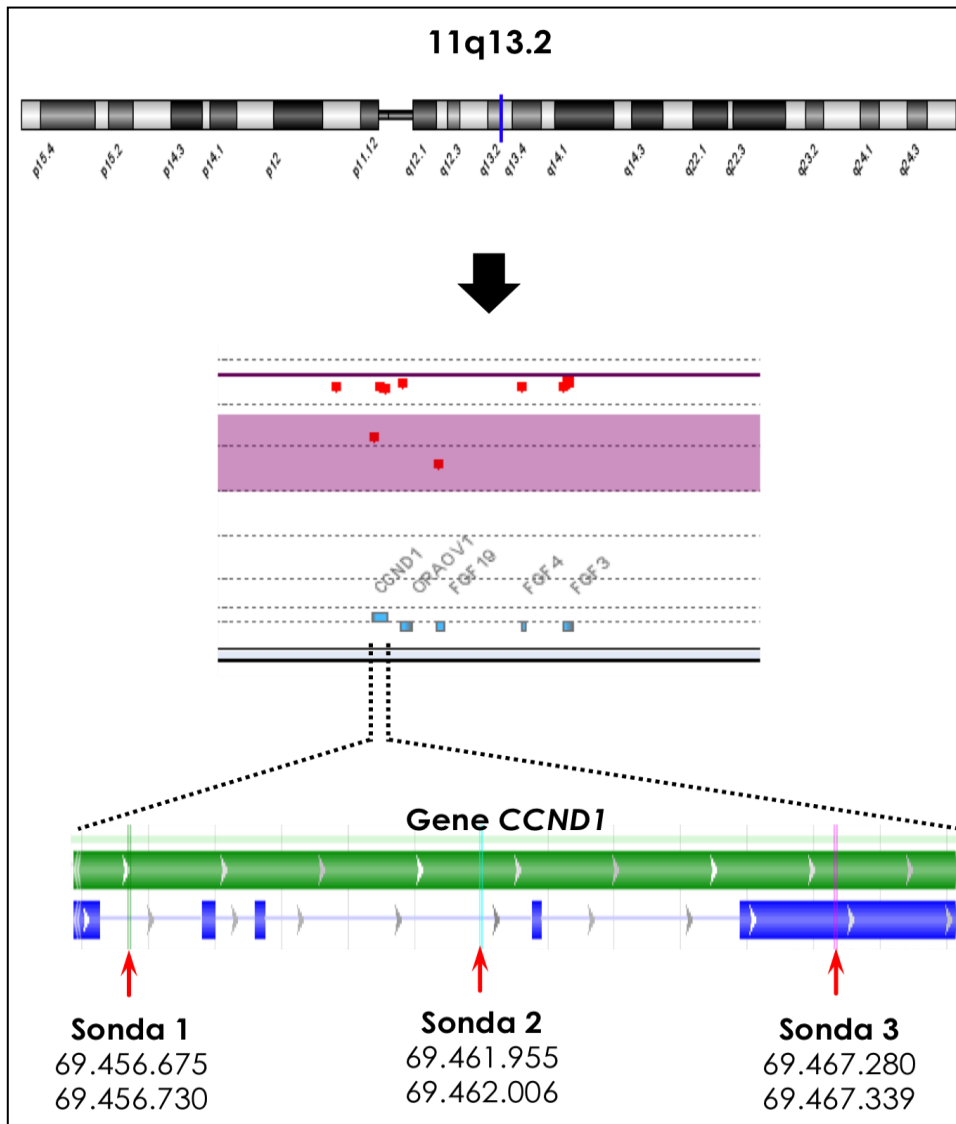


Figura 15 - Representação esquemática do ganho genômico envolvendo o gene *CCND1*, mapeado na região 11q13.2 em CEE, detectado por aCGH. As setas em vermelho indicam a região de mapeamento das sondas representada na plataforma de aCGH. Em azul, regiões exônicas do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

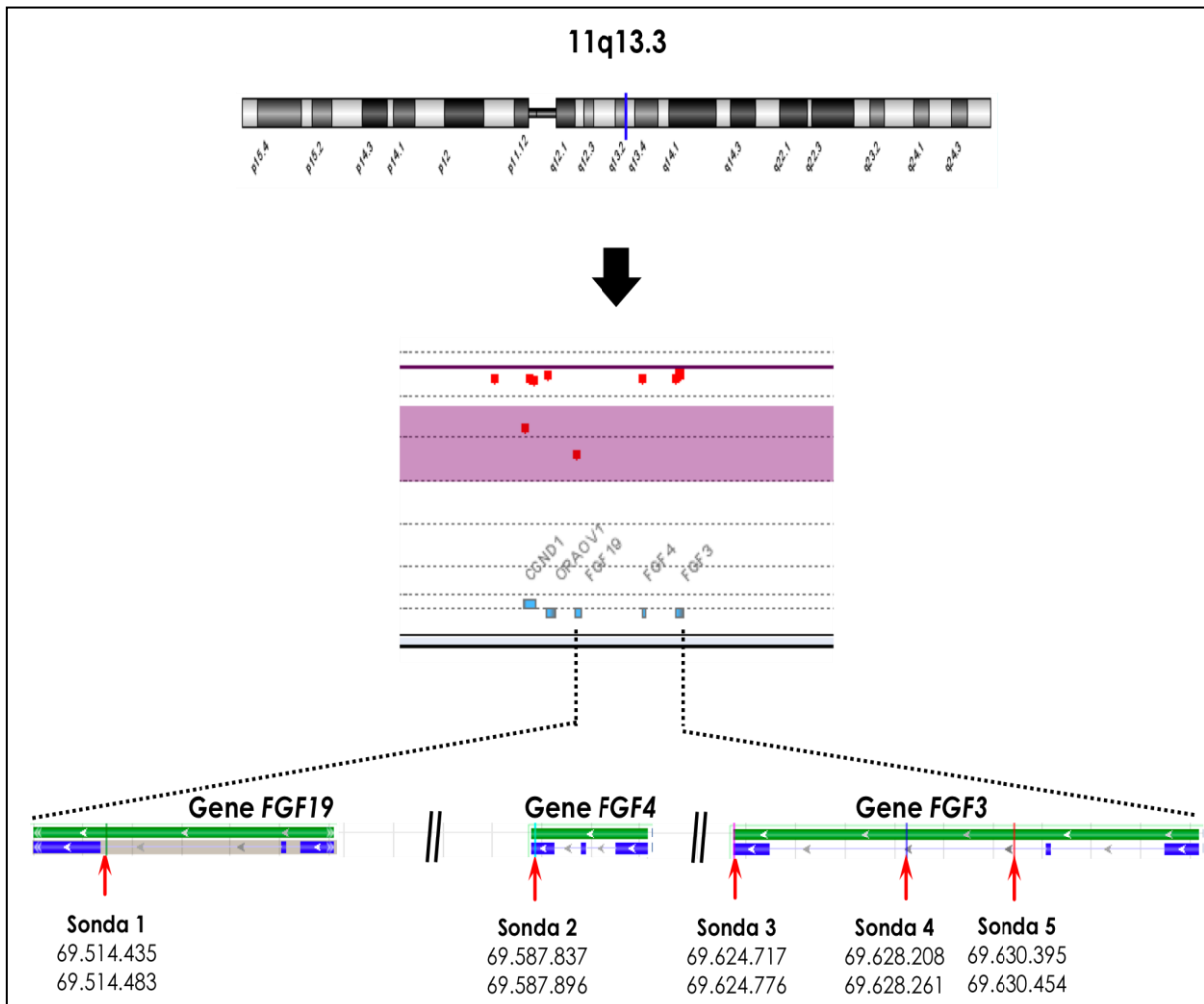


Figura 16 - Representação esquemática do ganho genômico envolvendo os genes *FGF19*, *FGF4* e *FGF3*, mapeado em 11q13.3 detectado por aCGH em casos de CEE. As setas em vermelho indicam o local de mapeamento das sondas representadas na plataforma de aCGH. Em azul, regiões exônicas do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

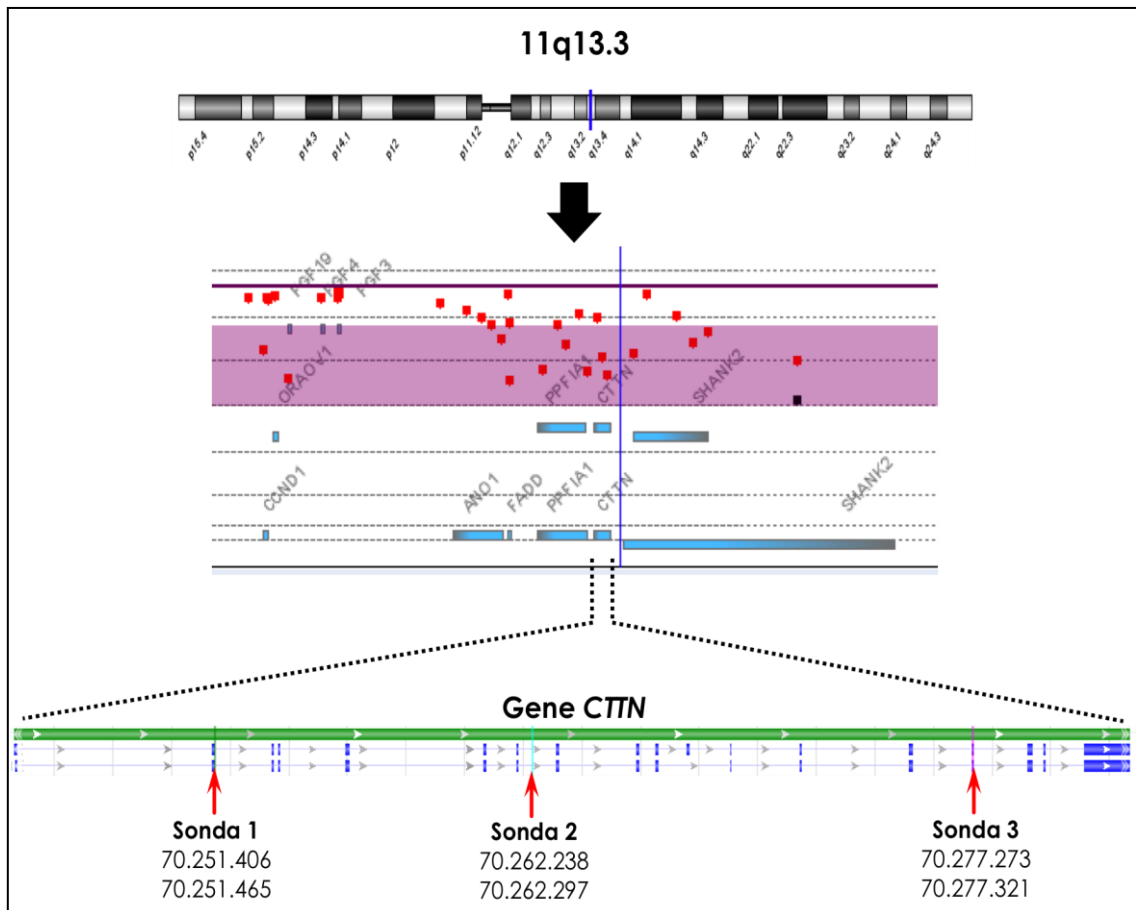


Figura 17 - Representação esquemática do ganho genômico envolvendo o gene *CTTN*, mapeado na região 11q13.3 detectado por aCGH em casos de CEE. As setas em vermelho indicam o local onde se mapeiam as sondas que revelaram alteração na análise de aCGH. Em azul, regiões exônicas do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

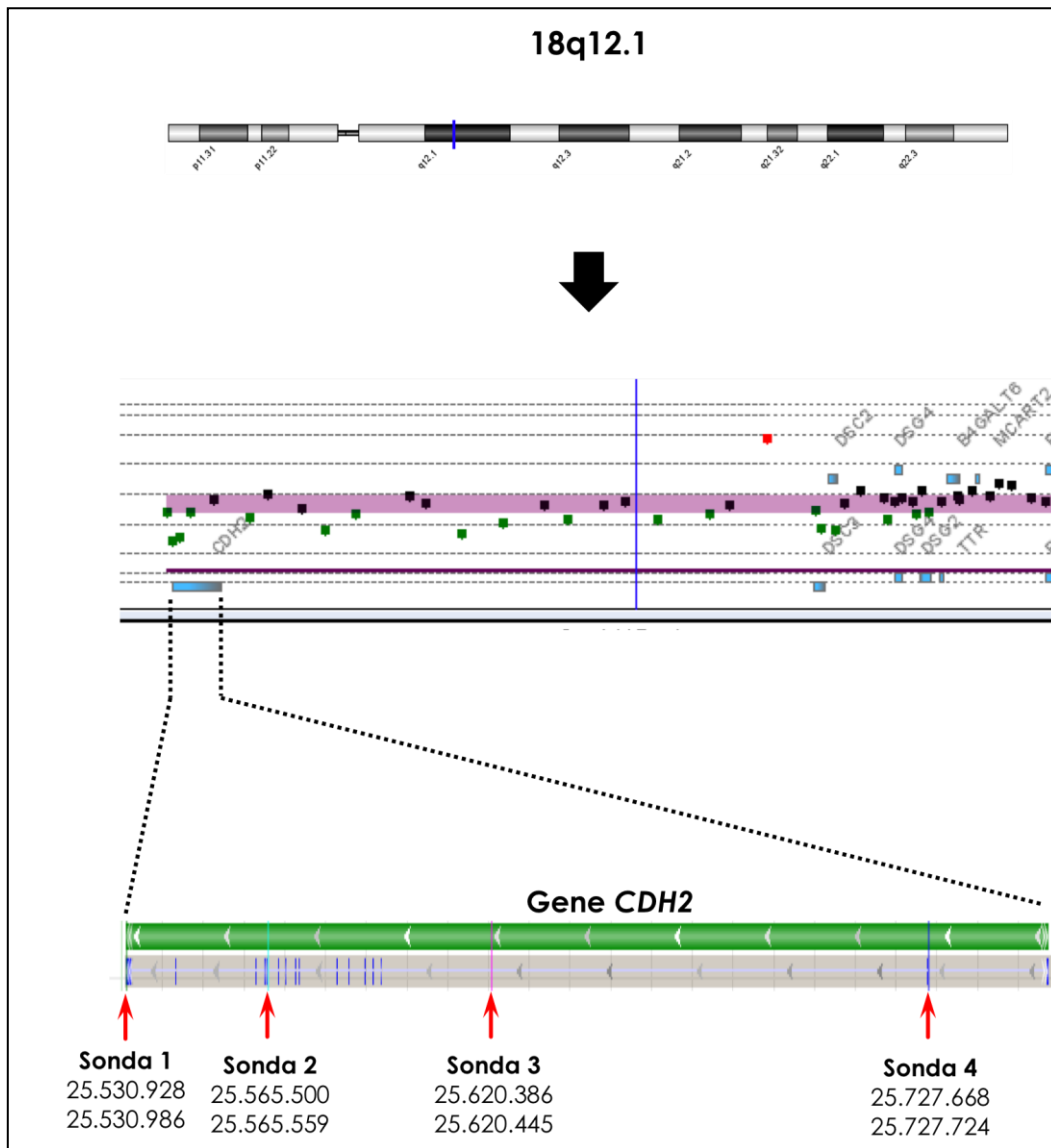


Figura 18 - Representação esquemática da perda genômica envolvendo o gene *CDH2*, mapeado em 18q12.1. As setas em vermelho indicam o local onde se mapeiam as sondas que mostraram alterações após a análise de aCGH. Em azul, regiões exônicas do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

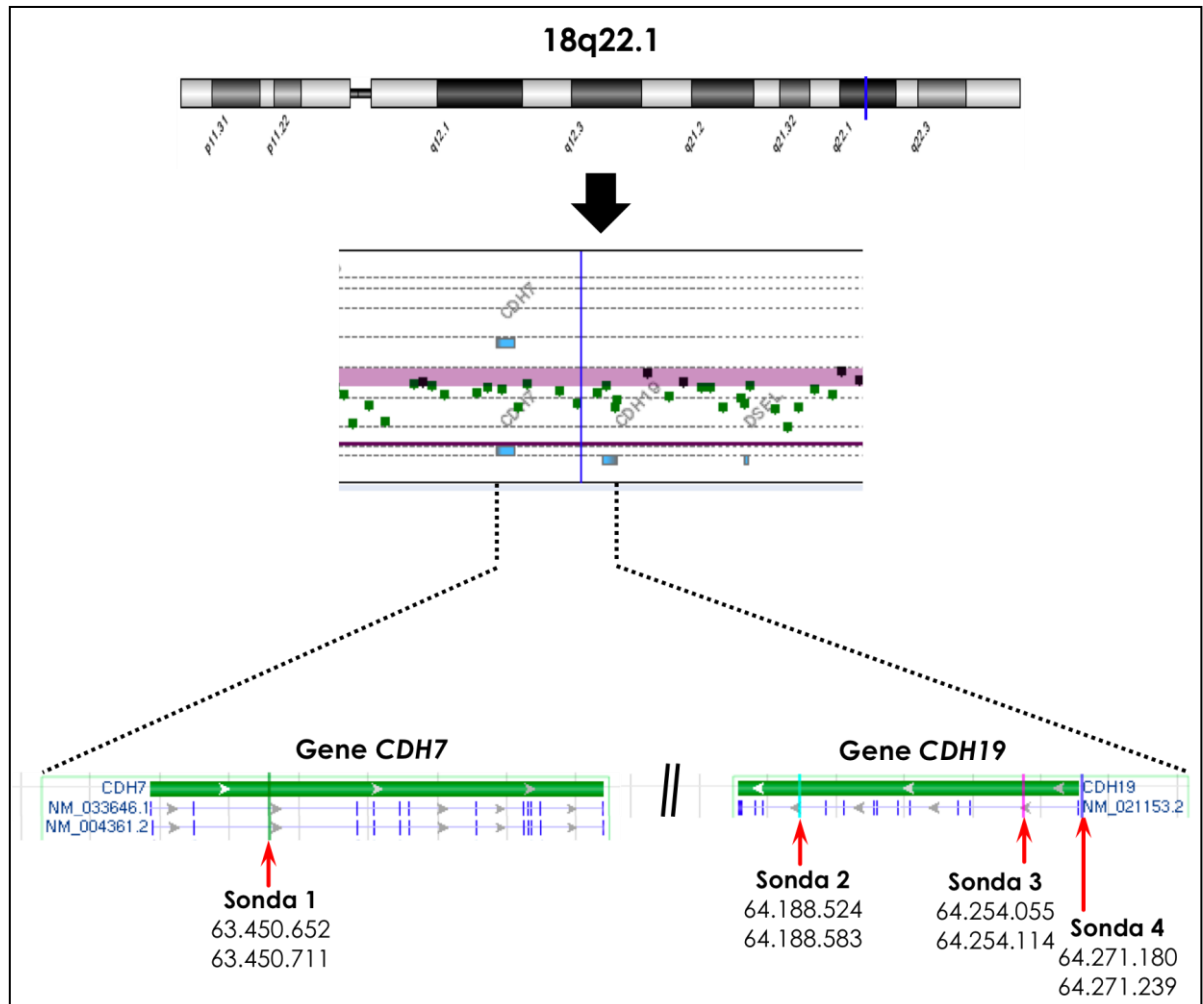


Figura 19 - Representação esquemática da perda genômica envolvendo os genes *CDH7* e *CDH19*, mapeados em 18q22.1. As setas em vermelho indicam o local onde se mapeiam as sondas que mostraram alteração na análise de aCGH. Em azul, regiões exônicas do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

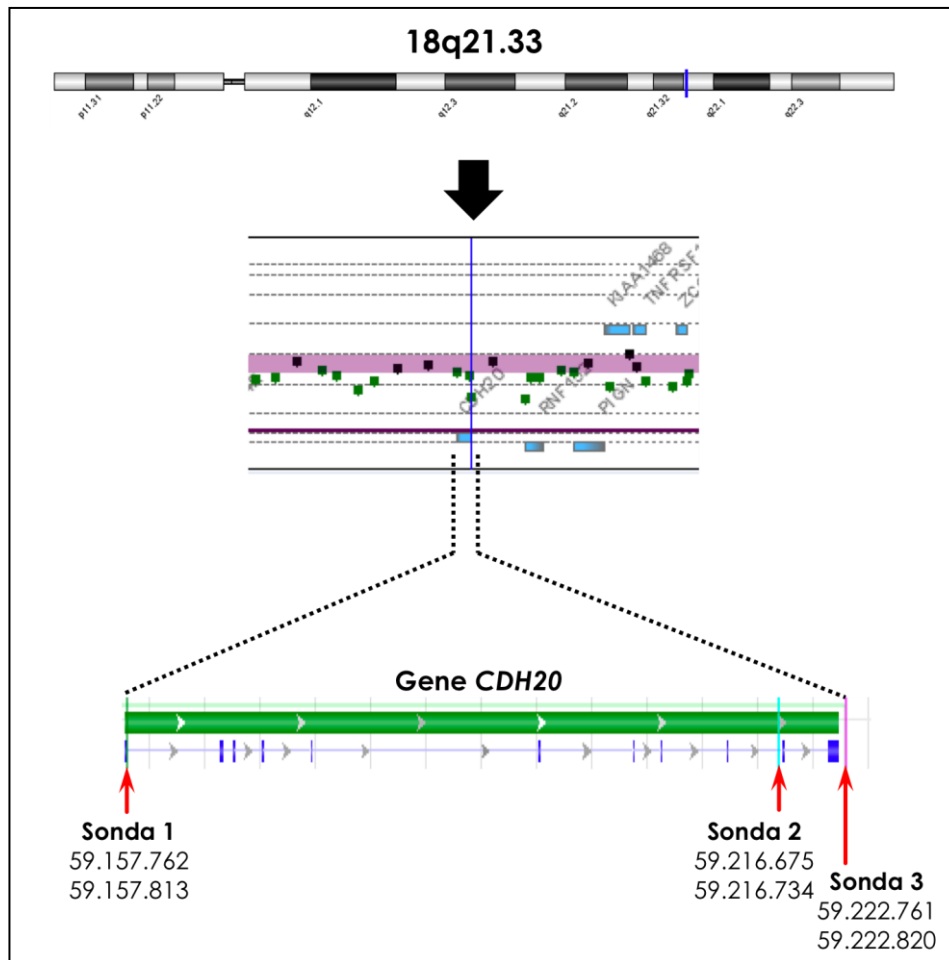


Figura 20 - Representação esquemática da perda genômica envolvendo o gene *CDH20*, mapeado em 18q21.33. As setas em vermelho indicam o local onde se mapeiam as sondas que mostraram alteração na análise de aCGH. Em azul, regiões exônicas do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

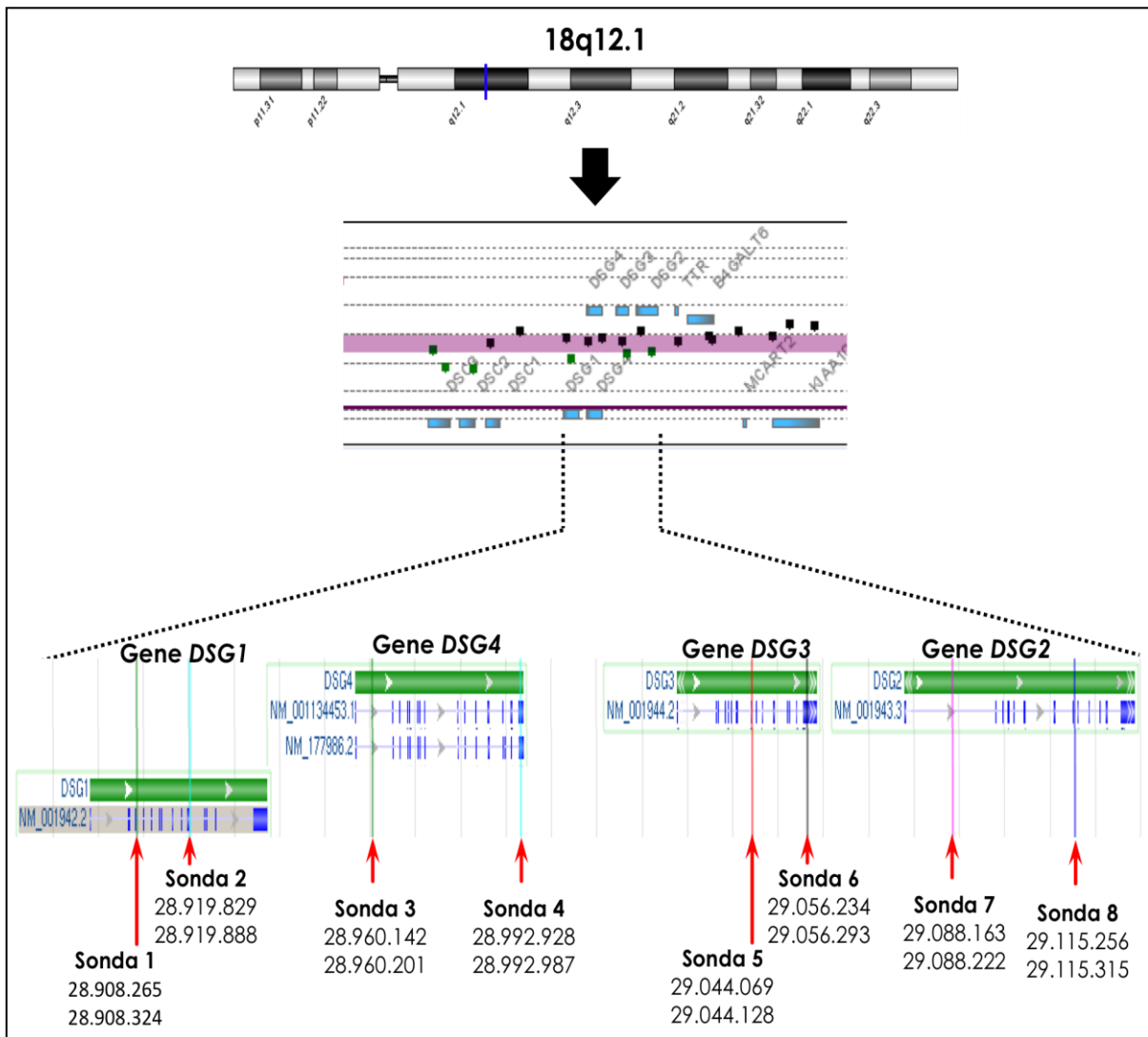


Figura 21 - Representação esquemática da perda genômica envolvendo os genes *DSG1*, *DSG2*, *DSG3* e *DSG4*, mapeados em 18q12.1. As setas em vermelho indicam região de mapeamento das sondas alteradas detectadas na análise de aCGH. Em azul, regiões que correspondem aos éxons do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

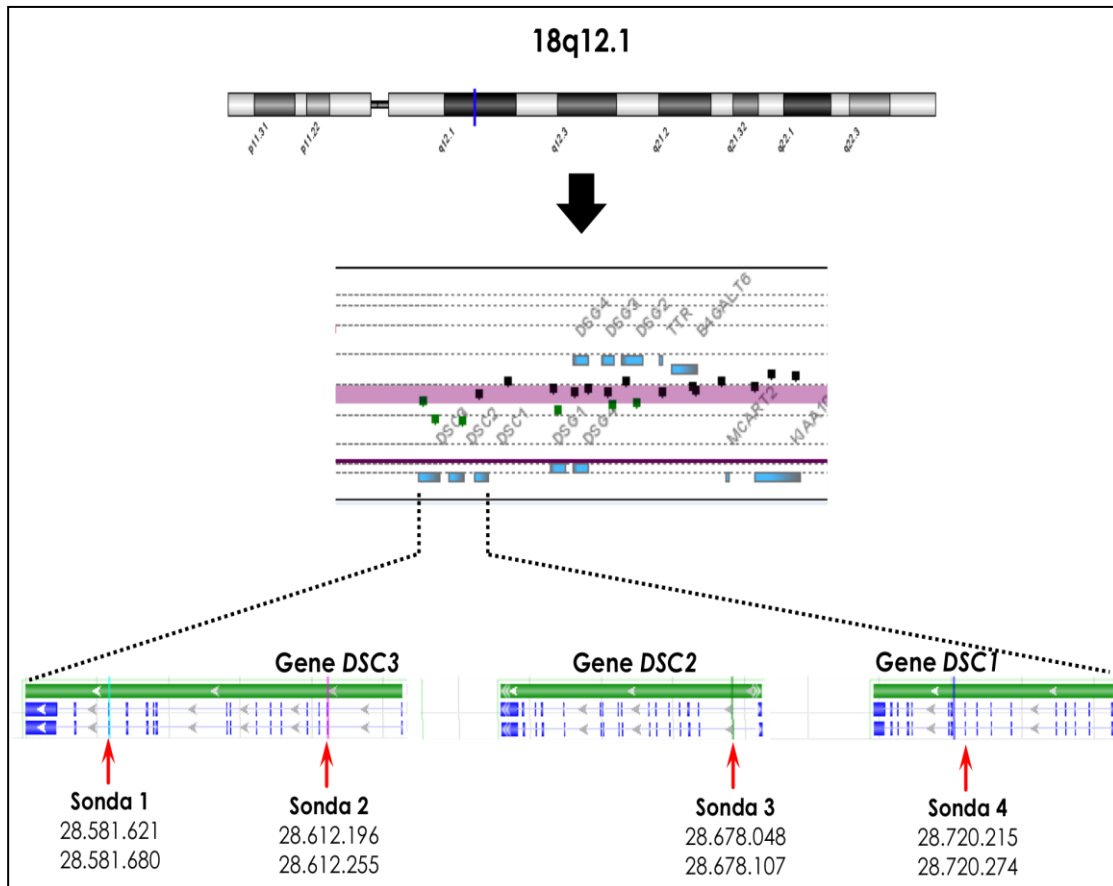


Figura 22 - Representação de perda genômica envolvendo os genes *DSC1*, *DSC2* e *DSC3*, mapeado na região 18q12.1. As setas em vermelho indicam a região de mapeamento das sondas alteradas detectadas na análise de aCGH. Em azul, regiões que correspondem aos éxons do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

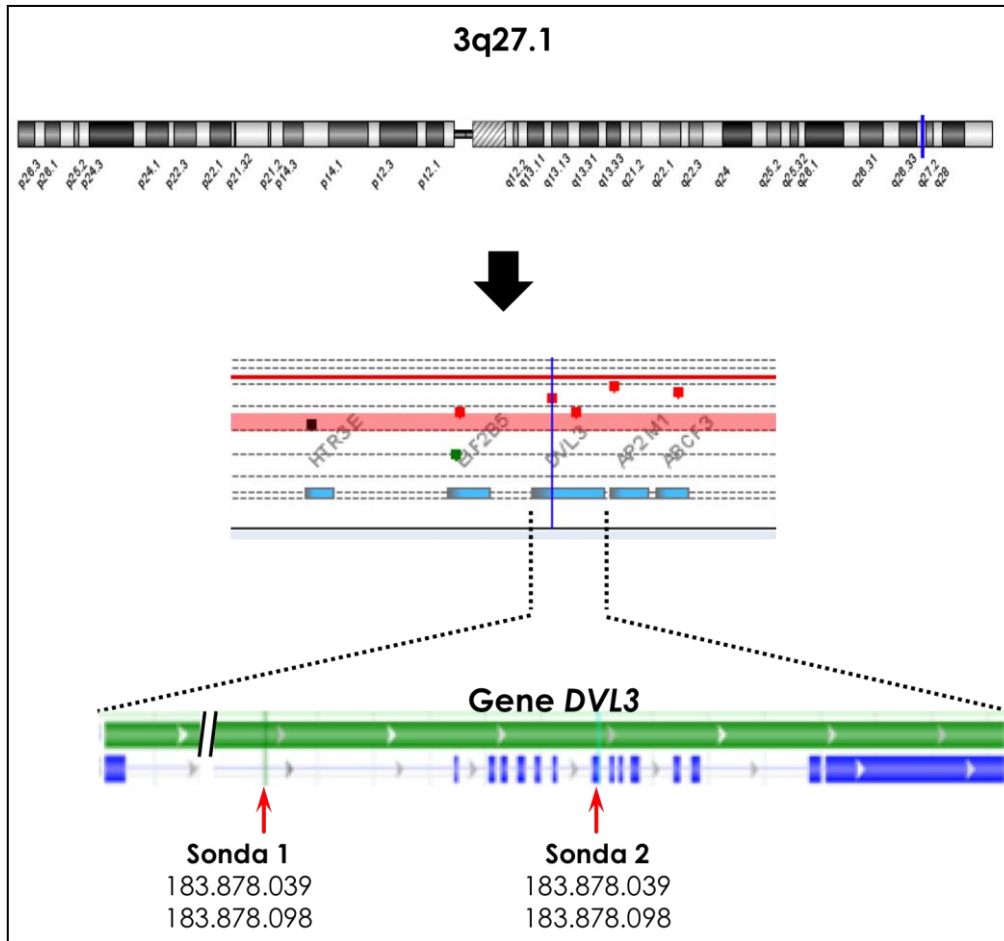


Figura 23 - Representação esquemática do ganho genômico envolvendo o gene *DVL3*, mapeado em 3q27. As setas em vermelho indicam região de mapeamento das sondas alteradas detectadas na análise de aCGH. Em azul, regiões que correspondem aos éxons do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

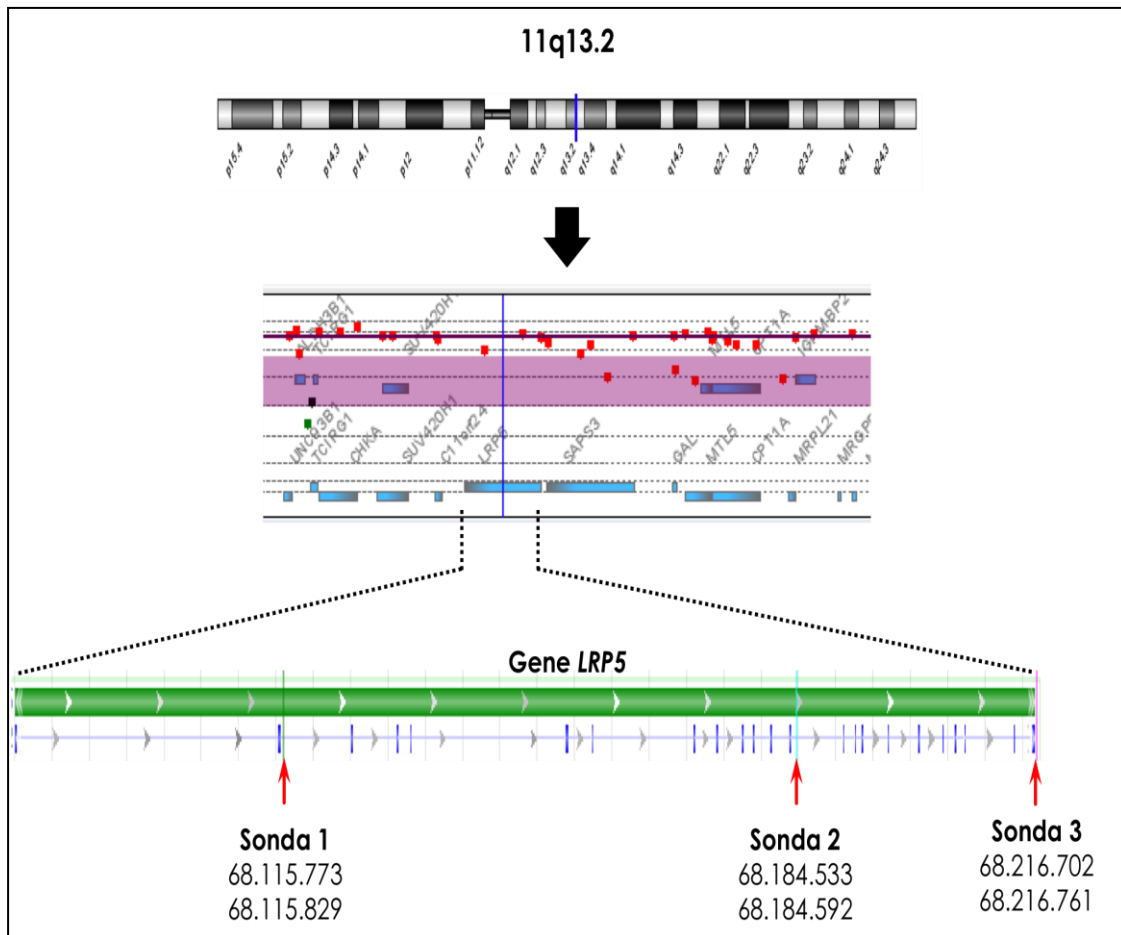


Figura 24 - Representação esquemática de ganho genômico envolvendo o gene *LRP5*, mapeado em 11q13.2. As setas em vermelho indicam região de mapeamento das sondas alteradas detectadas na análise de aCGH. Em azul, regiões que correspondem aos éxons do gene. Os números abaixo de cada sonda referem-se ao local de mapeamento das sondas (*start* e *end*).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A identificação de alterações genômicas em CEE têm sido relatadas por diversos autores, utilizando tanto a técnica de HR-CGH quanto a de aCGH. Adicionalmente, algumas das alterações identificadas foram associadas a fatores prognósticos em CEE. Muitas das regiões alteradas descritas em literatura também foram identificadas no presente estudo.

5.1 HR-CGH

Utilizando a técnica de HR-CGH, foram identificadas alterações envolvidas em ganhos e perdas genômicas em uma série de 21 casos de CEE. No total, foram identificadas 1038 alterações genômicas, com um número médio de 50 alterações por caso. Foram detectadas 155 alterações, envolvendo regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos, presentes em mais de 30% dos 21 casos de CEE.

Alterações cromossômicas envolvendo ganhos e perdas genômicas tem sido avaliadas por diversos autores utilizando a técnica de CGH cromossômico, e muitas dessas alterações têm sido associadas a fatores prognósticos em CEE (Anexo 4) (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; NOGUCHI et al. 2003; SHIOMI et al. 2003; UENO et al. 2003; YEN et al. 2003; KWONG et al. 2004; WANG et al. 2006; SUGIMOTO et al. 2007; QIN et al. 2008).

Os ganhos nas regiões mínimas comuns 11q12 e 11q13, detectadas pela técnica de HR-CGH, encontram-se entre as alterações mais freqüentes entre os casos avaliados, presentes em 71,4% e em 61,9% das amostras, respectivamente. Tais regiões já foram descritas por vários autores em CEE, sendo recorrentes nesse tipo tumoral, sugerindo que essas regiões podem conter genes importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; NOGUCHI et al. 2003; SHIOMI et al. 2003; YEN et al. 2003; KWONG et al. 2004; WANG et al. 2006; SUGIMOTO et al. 2007; QIN et al. 2008). No entanto, poucos estudos verificaram a associação entre tais alterações e fatores clínico-patológicos. Ueno et al. (2002) relataram que ganhos em 11q13 foram mais freqüentes em casos em estadio I (UENO et al. 2002). Apesar da alta freqüência de tais alterações no presente estudo, não foram encontradas associações significativas entre ganhos nessas regiões e variáveis clínico-patológicas.

As alterações envolvendo ganhos em 1q22-q23 e 1q31 também foram freqüentes entre os casos do presente estudo (66,7% e 42,9%, respectivamente). Dois estudos chineses descreveram ganhos genômicos em 1p11-q22, que envolve a citobanda 1q22 identificada no presente estudo (WANG et al. 2006; QIN et al. 2008). Os ganhos em 1q31 foram identificados por KWONG et al (2004) e QIN et al. (2008). QIN et al. (2008) mostraram que casos com metástase linfonodal apresentaram alterações em 1q22-q23 e em 1q31 mais freqüentemente do que casos com ausência de comprometimento linfonodal (QIN et al. 2008). No presente estudo, ganhos

em 1q22-q23 mostraram estar associados a CEE mais diferenciados, sugerindo que genes presentes em tal região podem estar envolvidos em fases mais tardias do desenvolvimento tumoral. Adicionalmente, casos apresentando ganhos em 1q12-q13 foram mais freqüentes em amostras que não apresentaram metástase linfonodal, sugerindo que a presença dessa alteração confere um comportamento menos invasivo a esses tumores. A presença de genes supressores de tumor ou de microRNAs mapeados nessa região poderia estar conferindo essa característica menos invasiva a esses tumores. Embora em baixas freqüências, foram observados ganhos genômicos em 1p12-p13 (28,6%) e 1p21-p22 (28,6%). Tais regiões também foram descritas por outros autores (SHIOMI et al. 2003; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008).

Os ganhos genômicos em 2p11.2, 2p12 e 2p13, detectados em 52,4%, 42,9% e em 28,6% dos casos, respectivamente, são consistentes com os achados de Noguchi et al. (2003) (NOGUCHI et al. 2003). No entanto, diferentemente de nossos achados, estes autores relataram uma associação entre invasão linfática e ganhos em 2p (NOGUCHI et al. 2003).

No presente estudo, foram detectados ganhos envolvendo 3q12-q13.1 e 3q13.1-q13.3 em 33,3% e em 42,9% dos casos, respectivamente. Tais dados são concordantes com estudos prévios, que mostraram ganhos em 3q (NOGUCHI et al. 2003; QIN et al. 2008). Alterações genômicas nessas regiões têm sido associadas a infiltração tumoral (NOGUCHI et al. 2003) e presença de metástase linfonodal (QIN et al. 2008). Em nossos achados,

não foi observada nenhuma associação entre alterações nessas regiões e fatores clínicos e patológicos.

Dados apresentados por um grupo da China revelaram a presença de ganhos genômicos em grandes segmentos do cromossomo 4, envolvendo 4p13-q31, concordante com as alterações detectadas no presente estudo envolvendo 4p12-p13, 4q12-q13, 4q24, 4q25-q26, 4q26-q27 e 4q28 (WANG et al. 2006; QIN et al. 2008). Esse mesmo grupo também mostrou ganhos em 6p12-q14 e em todo o braço longo do cromossomo 6. Em nossa análise, foram detectados ganhos envolvendo as regiões 6p21.3 (38,1%), 6q12 (42,9%), 6q13-q14 (38,1%), 6q16 (33,3%) e 6q21 (38,1%). Esta última região mostrou associação significativa com grau histológico, mostrando ganhos genômicos com maior frequência em amostras tumorais bem ou moderadamente diferenciadas. Na literatura, há relatos de que ganhos em 6p são mais frequentes em casos com metástase linfonodal (QIN et al. 2008), porém, tal associação não foi encontrada neste estudo.

Similar aos nossos resultados, os ganhos em 7q11.2, 7q21 e 7q22 também foram identificados em outros estudos (YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; YEN et al. 2003; KWONG et al. 2004; QIN et al. 2008). No entanto, YEN et al. (2002) mostraram que alterações em 7q estão associados a pior prognóstico. SEWRAM et al (2003) relataram que ganhos em 7q22 são mais comuns em amostras em estadios mais precoces (UENO et al. 2002). Neste estudo, alterações nas regiões mencionadas não mostraram associação com fatores prognósticos em CEE.

Os ganhos envolvendo o braço longo do cromossomo 8 foram relatados por diversos autores (NOGUCHI et al. 2003; SHIOMI et al. 2003; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008), em concordância com os achados de ganhos em 8q11.2 (28,6%) e 8q13 (33,3%) aqui apresentados. Ganhos envolvendo 8q tem sido associados a fatores como infiltração tumoral (NOGUCHI et al. 2003) e metástase linfonodal (QIN et al. 2008). Comprometimento linfonodal também foi associado a ganhos em 12p (QIN et al. 2008). Os ganhos em 12p11.2 foram identificados em 38,1% dos casos, porém, nenhuma associação com comprometimento linfonodal foi observada na presente casuística.

Dados resultantes da análise de HR-CGH mostraram que houve um predomínio de alterações envolvendo perdas genômicas. Neste estudo, foram detectadas perdas envolvendo as regiões 1p31, 1p33 e 1p36.1-p36.3, em uma freqüência em torno de 50% dos casos, mas nenhuma associação foi observada com variáveis clínico-patológicas. Tais alterações também foram descritas em relatos anteriores (YEN et al. 2001; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008). No entanto, apenas um deles mostrou que perdas em 1p são mais freqüentes em casos com metástase linfonodal (QIN et al. 2008).

No presente estudo, foram identificadas perdas em 3p12-p13 (28,6%), 3p24 (42,9%) e em 3p25 (28,6%). As alterações envolvendo perdas em 3p foram relatadas por diversos autores (YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; SHIOMI et al. 2003; YEN et al. 2003; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008; TAN e REIS-FILHO 2008). As perdas em 3p foram associadas a metástase linfonodal (QIN et al. 2008), o que difere dos achados deste estudo, em que

foi observado que perdas em 3p24 e em 3p25 foram mais freqüentes em amostras sem comprometimento linfonodal. A presença de oncogenes ou de microRNAs mapeados nessas regiões poderiam conferir essa característica menos invasiva a esses tumores.

Adicionalmente, foi observado que perdas em 3p25 estava significativamente associada a estadios mais precoces (I e II). Dados similares foram relatados por Ueno et al. (2002), que demonstraram que perdas envolvendo 3p21-pter foram mais freqüentes em casos com estadio I (UENO et al. 2002).

Perdas em 4p15.1 (33,3%), 4p15.2-p15.3 (76,2%), 4q31,2 (28,6%) e em 4q32-q33 (28,6%) foram observadas entre as amostras avaliadas por HR-CGH concordantes com dados da literatura em CEE (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; KWONG et al. 2004; WANG et al. 2006). Perdas no cromossomo 4 foram associadas com metástases linfonodais (QIN et al. 2008). Yen et al. (2001) demonstraram que perdas em 4p14-p15.3 foram mais freqüentes em casos em estadio IV e estavam associadas a pior prognóstico em CEE (YEN et al. 2001). Ueno et al. (2002) descreveram que perdas em 4q32-q33 eram mais freqüentes em casos em estadios mais precoces (UENO et al. 2002). No presente estudo, não foi constatada nenhuma associação entre alterações no cromossomo 4 e variáveis clínico-patológicas.

Concordantes com dados aqui descritos, estudos prévios relataram a ocorrência de perdas genômicas em 5q (YEN et al. 2001; SHIOMI et al. 2003; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008), incluindo as regiões 5q32, 5q33,

5q34-q35 identificadas no presente estudo, em 28,6%, 33,3% e em 66,7% dos casos, respectivamente. Porém, em nossos dados, nenhuma associação entre tais alterações e fatores clínicos e patológicos foi encontrada.

As perdas genômicas envolvendo 6q22 (28,6%), 6q24 (42,9%), 6q25 (38,1%), 6q26 (33,3%), 6q27 (33,3%), 7q32-q33 (33,3%) e 7q34-q36 (66,7%) aqui descritas também foram relatadas por Yen et al. (2003) (YEN et al. 2003); no entanto, nenhuma associação entre perda em tais regiões e fatores clínico-patológicos foi verificada pelos autores. No presente estudo, foi observado que casos mais diferenciados mostraram maior frequência de ganhos em 6q21.

Neste estudo, foram observadas perdas em 8p12 e 8p22, em 28,6% e 47,6% dos casos, respectivamente. Alterações nessas regiões já foram descritas em literatura (TADA et al. 2000; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008), embora haja relatos de maior frequência de tais perdas em casos de CEE em estadios mais avançados (YEN et al. 2001), o que não foi encontrado neste estudo.

Perdas genômicas em 9p12, 9p13 e em 9p21-p23 foram observadas em 42,9%, 66,7% e 81% das amostras, respectivamente; a frequência de perdas em 9q21, 9q22, 9q31 e 9q32 foi de 38,1%, 42,9%, 47,6% e 42,9%, respectivamente. Tais alterações já foram descritas em estudos anteriores, como em 9p12 (YEN et al. 2003), 9p13 (YEN et al. 2003; KWONG et al. 2004), 9p21-p23 (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; YEN et al. 2003), 9q21 (YEN et al. 2001; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008;

SUGIMOTO et al. 2009), 9q22, 9q31 e 9q32-q34 (WANG et al. 2006; QIN et al. 2008). YEN et al. (2001) relataram que perdas em 9p21 e em 9q21 foram mais freqüentes em casos com estadios mais avançados; porém, apenas a alteração envolvendo 9p estava associada a pior prognóstico. UENO et al. (2002) também observaram diferenças nas freqüências de perdas em 9p21 em casos com diferentes estadiamentos. Em nossa casuística, alterações envolvendo o cromossomo 9 não mostraram associação com variáveis clínico-patológicas em CEE.

Os dados em literatura mostram que perdas genômicas em 10p e em 10q são mais freqüentes em CEE com presença de metástase linfonodal (QIN et al. 2008). Apesar da associação entre as alterações cromossômicas e variáveis clínico-patológicas não terem sido encontradas no presente estudo, foram detectadas perdas em 10p13, 10p14, 10q24-q25 e 10q25-q26 entre os CEE avaliados, numa freqüência de 28,6 a 52,4% dos casos.

As perdas genômicas em 11p14 (38,1%) e 11p15 (52,4%) foram identificadas em nossa casuística, sendo concordantes com os achados de Tada et al. (2000)(TADA et al. 2000). As regiões 11q22 (28,6%) e 11q23-q25 (61,9%) estavam envolvidas em perdas genômicas no presente estudo, assim como em outros relatos da literatura (WANG et al. 2006; QIN et al. 2008). Porém, nenhuma dessas regiões mostrou associação com fatores prognósticos em CEE avaliados no presente estudo, o que difere de dados prévios em literatura. Perda envolvendo 11q22-q23 foi relacionada a fatores como estadiamento tumoral e metástase linfonodal (UENO et al. 2002). Adicionalmente, Yen et al. (2001) relataram que casos que apresentaram

perdas envolvendo 11q23-qter apresentaram pior prognóstico (YEN et al. 2001).

Embora não existam relatos anteriores em literatura, alterações envolvendo perdas em 12p12 (38,1%), 12p13 (33,3%), 12q15-q21 (38,1%), 12q22 (52,4%), 12q23-q24 (81,0%), 12q24.1-q24.2 (81,0%) e 12q24.3 (76,2%) foram detectadas no presente estudo. Adicionalmente, casos com ausência de invasão linfática apresentavam mais freqüentemente perdas em 12q24.3, indicando que possíveis oncogenes podem estar mapeados em tal região e sua perda pode conferir uma característica de melhor prognóstico em CEE.

Neste estudo, foram identificadas perdas genômicas envolvendo 13q21 (57,1%), 13q22 (61,9%), 13q31 (42,9%) e 13q32 (33,3%). As perdas envolvendo 13p e 13q têm sido freqüentemente observadas em casos de CEE (SHIOMI et al. 2003; WANG et al. 2006; QIN et al. 2008), sendo associados à presença de metástase linfonodal (QIN et al. 2008). Tais dados corroboram com os dados aqui descritos, em que perdas em 13q31 foram mais freqüentes em casos com comprometimento linfonodal, indicando que algum supressor de tumor mapeado nessa região pode estar desempenhando uma função no prognóstico de CEE.

No cromossomo 15, foram identificadas perdas em 15q12 (33,3%), 15q14 (52,4%), 15q21 (38,1%), 15q22-q24 (47,6%) e em 15q25-q26 (52,4%). Perdas genômicas em 15q25-q26 foram mais freqüentemente detectadas nos casos com estadios I e II, sugerindo ser este um evento

precoce da tumorigênese de esôfago. Para o nosso conhecimento, não existem dados em literatura relatando alterações em tais regiões em CEE.

As perdas em 16p foram relatadas em estudos anteriores (YEN et al. 2001), inclusive, ocorrendo com maior frequência em casos com invasão linfonodal (NOGUCHI et al. 2003). Embora a associação com comprometimento linfonodal não tenha sido observada entre os casos aqui estudados, foram também observadas perdas em 16p11.2, 16p12, 16p13.1-p13.2, 16p13.3, 16q21-q22 e 16q23, em frequência variando de 42,9 a 66,7% dos casos.

As perdas em 18p11.2-p11.3, 18q11.2, 18q12, 18q21-q22 e 18q23, foram detectadas em nossa casuística, com frequências variando de 42,9 a 71,4% das amostras. Dentre tais alterações, perdas em 18q21-q22 e em 18q23 foram descritas por diversos autores em CEE (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; SHIOMI et al. 2003; UENO et al. 2003; YEN et al. 2003; WANG et al. 2006; SUGIMOTO et al. 2007; QIN et al. 2008). No entanto, diferentemente de nossos resultados, alguns destes estudos sugerem que perdas em 18q21-qter são mais frequentes em casos em estadio I (UENO et al. 2002). Adicionalmente, em outro estudo, Qin et al. (2008) demonstraram que perdas em 18q ocorrem mais frequentemente em casos com metástase linfonodal (QIN et al. 2008).

De modo semelhante ao cromossomo 18, perdas em 19p13.1, 19p13.2-p13.3, 19q13.1, 19q13.2, 19q13.3-q13.4 também foram frequentes estando presentes em mais de 50% dos casos. Tais alterações também já foram descritas em estudos anteriores (YEN et al. 2001; KWONG et al.

2004; WANG et al. 2006) e perdas apenas em 19p foram associadas à presença de metástase linfonodal (QIN et al. 2008), o que não foi observado no presente estudo. Porém, perdas em 19q13.1 e em 19q13.2 mostraram associação significativa com casos de CEE mais diferenciados.

Apesar do baixo número de casos avaliados, o que confere um baixo poder estatístico às análises apresentadas, os dados do presente estudo confirmam os achados de alterações genômicas já descritas em literatura e descreve novas regiões cromossômicas que precisam ser melhor investigadas e que podem estar envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral em CEE.

Todos os estudos descritos na análise comparativa com os nossos achados utilizaram a técnica de CGH convencional e não HR-CGH. A resolução da técnica de CGH cromossômico convencional para a detecção de alterações genômicas é de cerca de 5-10Mb (SNIJDERS et al. 2003; HUGHES et al. 2004; SHIH IE e WANG 2005; BEJJANI e SHAFFER 2006). Enquanto que pela metodologia de HR-CGH, há um considerável aumento de resolução, para cerca de 2-5Mb, melhorando a capacidade de detecção de alterações que antes não era possível pelo CGH convencional. No entanto, é possível observar variações na resolução apresentada pela técnica de HR-CGH, que pode depender de fatores como condições de hibridação, critérios de análise, região cromossômica envolvida, qualidade das metáfases e grau de condensação cromossômica. Tais fatores podem interferir na taxa de detecção de alterações genômicas, permitindo ou não a detecção destas em determinadas regiões cromossômicas (SCHOUmans

et al. 2004). Além disso, o tamanho da casuística também pode ter influenciado na discrepância observada entre os dados aqui descritos e os já relatados na literatura. Em estudos prévios, é possível observar casuísticas que variam de três e 60 casos avaliados e no presente estudo, foram analisados 21 casos de CEE.

Adicionalmente, algumas das discrepâncias entre os dados descritos por estudos prévios e os aqui apresentados podem ser resultantes da contaminação das amostras de DNA por outras células não tumorais. A homogeneidade das amostras de DNA extraídas das amostras tumorais garante uma maior especificidade e sensibilidade durante as análises de alterações genômicas (ROGATTO 2000). No presente estudo, em etapa anterior a extração de DNA, as amostras de CEE em FFEP foram submetidas a microdissecção manual (*Scrape*) ou a laser (LCM), para garantir a não contaminação com outros tipos celulares. Entre os relatos já descritos em literatura, alguns autores mencionam a realização de microdissecção por *scrape* com agulha fina em suas amostras (UENO et al. 2002; SHIOMI et al. 2003; UENO et al. 2003; QIN et al. 2008; SAKAI et al. 2009).

Um dos fatores limitantes na utilização de microdissecção de amostras tumorais é a quantidade limitada de amostra obtida, o que pode ser resolvida com a realização de amplificação de DNA genômico obtidos das amostras. Para esse estudo, foi realizada a amplificação de DNA utilizando protocolo baseado na PCR, método *SCOMP* (*Single-cell comparative genomic hybridization*), que permite a amplificação homogênea

do genoma. A confiabilidade e a sensibilidade dessa metodologia foi demonstrada em estudos de CGH, envolvendo tanto amostras a fresco (KLEIN et al. 1999) quanto FFEP (STOECKLEIN et al. 2002). No entanto, durante tal processo de amplificação do genoma, pode ocorrer a amplificação de alvos preferenciais, como regiões ricas em seqüências repetitivas, o que poderia causar um viés na detecção de alterações genômicas. No presente estudo, uma forma de minimizar esse erro, foi a utilização de intervalos de referência baseadas em uma biblioteca de DNAs normais também previamente amplificados por *SCOMP*.

5.2 CGH ARRAY

O método de aCGH supera as limitações encontradas em CGH cromossômico, sobretudo com relação a resolução das alterações de ganhos e perdas genômicas, já que pela técnica de CGH cromossômico, o limite de detecção de perdas e ganhos de seqüências cromossômicas é de cerca de 5-10Mb (SNIJDERS et al. 2003; HUGHES et al. 2004; SHIH IE e WANG 2005; BEJJANI e SHAFFER 2006).

No presente estudo, foram detectadas 191 alterações genômicas, sendo que para cada caso, o número médio foi de 10,6 aberrações ($dp=9,5$ alterações), variando de 2 a 35 alterações/caso. O maior número de alterações foi observado no caso ESOP9, enquanto que as amostras ESOP1, ESOP4 e ESOP39 mostraram apenas duas alterações genômicas. Comparando os dados clínico-patológicos de tais casos, foi possível

observar que o caso ESOP9 possui estadiamento mais avançado, com presença de metástase linfonodal e nível mais avançado de infiltração tumoral. Por outro lado, amostras tumorais com menor número de alterações mostraram comportamento menos agressivo, sugerindo a ocorrência de maior instabilidade cromossômica nos tumores mais agressivos.

No presente estudo, foram identificadas alterações em regiões mínimas comuns mais freqüentes entre os casos de CEE. Inicialmente, para a detecção de tais alterações, apenas aquelas presentes em, no mínimo, cinco dos 18 casos avaliados foram consideradas para análise dos ganhos e perdas genômicas. No entanto, devido ao baixo número de perdas detectadas utilizando esse critério, foram consideradas as alterações presentes em, pelo menos, três casos. Dessa maneira, foram detectadas 38 alterações genômicas em regiões mínimas comuns, incluindo 21 envolvidas em ganhos e 17 em perdas.

Há um número limitado de estudos descrevendo alterações do número de cópias de DNA em CEE por aCGH. Comparando os achados do presente estudo com dados de literatura, foi possível identificar regiões consistentes de perdas e ganhos genômicos em CEE (Anexo 5).

Os ganhos genômicos foram mais freqüentes em regiões mínimas comuns em 3q, 8q e 11q, sendo consistentes com dados relatados em literatura (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008; SUGIMOTO et al. 2009).

Foram identificados ganhos envolvendo somente o braço longo do cromossomo 3, em 3q22.2-q22.3, 3q23-q24, 3q25.1, 3q25.1-q25.2, 3q25.2-

q26.31 e 3q26.31-q29, em menos de 40% dos casos. Muitas dessas alterações já foram descritas em estudos anteriores, como 3q25.31, 3q26.31, 3q26.32, 3q27.1, 3q27.2, 3q27.3, 3q29 (HIRASAKI et al. 2007), 3q26.2 (KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007), 3q26 (ISHIZUKA et al. 2002) e 3q27.1-q29 (CARNEIRO et al. 2008). Não temos conhecimento de relatos em literatura de ganhos em 3q22.2-q22.3, 3q23-q24 e 3q25.1 observado em nosso estudo.

No cromossomo 8, foram detectadas três alterações envolvendo ganhos genômicos em 8q23.3-q24.22, 8q24.22 e 8q24.22-q24.3, em cerca de 30% das amostras. Ganhos em regiões inseridas em tais intervalos cromossômicos foram relatados em outros estudos por aCGH, como 8q23.3-q24.22 (ARAI et al. 2003), 8q24.21 (HIRASAKI et al. 2007), 8q24.13-q24.23 e 8q24.3 (CARNEIRO et al. 2008).

Os ganhos genômicos envolvendo 11q13.2-11q13.3 são recorrentes em CEE, como demonstrado por estudos prévios (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008; SUGIMOTO et al. 2009). No presente estudo, ganhos nestas regiões também foram detectados, merecendo destaque ganhos em 11q13.2, 11q13.2-q13.3 e 11q13.3, presentes em mais de 50% dos casos. Pela técnica de HR-CGH, ganhos em 11q13 também foram detectados neste estudo, corroborando os resultados da análise de aCGH.

Com relação as perdas genômicas, foram identificadas 17 alterações em regiões mínimas comuns em 3q, 5q, 8q, 9p, 14q, 18q, 19q e 21q.

As perdas genômicas no cromossomo 5 foram pouco freqüentes (16,7%), afetando as regiões 5q23.1, 5q31.3 e 5q35.2, dos quais apenas a primeira alteração já foi descrita por Hirasaki et al. (2007) (HIRASAKI et al. 2007). Perda em 5q35 também foi detectada pela técnica de HR-CGH em amostras FFEP de CEE.

Em concordância com os achados de HR-CGH, as alterações envolvendo perdas no braço curto do cromossomo 9 foram detectadas em 9p24.3, 9p24.3-p21.3, 9p21.3, 9p21.3-p21.1 e 9p13.3-p13.1 pela técnica de aCGH. Apesar da baixa freqüência observada no presente trabalho (16,7 a 27,7% dos casos), algumas dessas alterações já foram relatadas por outros autores, como 9p24.3, 9p24.3-p21.3 (CARNEIRO et al. 2008), 9p21.3 (KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008).

Uma freqüência baixa de casos apresentou perda nas regiões 18q12.1 (16,7%), 18q12.1-q23 (22,2%) e 18q23 (16,7%), que já foram descritas previamente em CEE (KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; SUGIMOTO et al. 2009).

Apesar de haver muitas alterações concordantes entre o presente estudo e trabalhos prévios descritos em literatura, foi possível identificar alterações genômicas não descritas previamente, como ganhos em 3q22.2-q22.3, 3q23-q24, 3q25.1 e em 3q25.1-q25.2, e perdas em 3q26.31, 5q31.3, 5q35.2, 8q23.3, 9p21.3-p21.1, 9p13.3-p13.1, 14q32.12, 19q13.11 e em 21q22.2-q22.3 (Anexo 5). O uso de diferentes plataformas para a análise por aCGH pelos diversos autores podem explicar essa discrepância entre os dados. A maioria dos trabalhos descritos utilizou plataformas contendo BACs

(ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008) e somente um estudo fez uso de plataforma de oligonucleotídeos (SUGIMOTO et al. 2009). Plataformas de diferentes tamanhos foram utilizadas, contendo desde 57 oncogenes (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003), 287 clones (KIM et al. 2006), 32K (CARNEIRO et al. 2008), 96.768 clones (HIRASAKI et al. 2007) e até plataformas mais representativas com 244K (SUGIMOTO et al. 2009) de seqüência genômicas. Essa variabilidade certamente dificulta uma comparação precisa entre os dados apresentados pelos diversos relatos em literatura.

A análise estatística para verificar associações entre as alterações detectadas por aCGH e variáveis clínico-patológicas mostrou que apenas ganhos em 11q13.3 estava significativamente associada a presença de invasão linfática ($p=0,022$). É possível que o baixo número de casos de CEE avaliados no presente estudo não permitiu a identificação de alterações em regiões específicas que possam influenciar no desenvolvimento e progressão tumoral.

Adicionalmente, a comparação entre os perfis de alterações genômicas dos casos de CEE de acordo com as variáveis clínico-patológicas foi realizada neste estudo, para verificar a existência de diferenças que possam influenciar no desenvolvimento e progressão tumoral. De acordo com os dados obtidos, não foram observadas diferenças entre os perfis de alterações de casos bem/moderadamente diferenciados e pouco diferenciados/indiferenciados, sugerindo que a instabilidade cromossômica parece não influenciar no grau histológico. Por outro lado,

casos que apresentaram infiltração tumoral atingindo a camada adventícia apresentaram maior número de alterações genômicas, indicando que tumores em estágios mais avançados de infiltração apresentam um perfil genômico mais instável. Outro aspecto a ser observado é que casos com infiltração tumoral até a camada muscular apresentaram predomínio de ganhos genômicos; no entanto, há uma inversão desse quadro em casos em que houve infiltração da adventícia.

Foi observado um maior número total de alterações em casos que não apresentaram invasão venosa e linfática. No entanto, no caso da invasão venosa, essa diferença entre os perfis de alterações pode ser explicada pelo número de casos avaliados, já que apenas dois (11,1%) casos apresentaram invasão, e em 16 (88,9%) casos a invasão venosa não foi observada. Considerando a invasão linfática, casos em que não houve comprometimento linfático (72,2%) foram mais frequentes do que aqueles com invasão linfática (27,8%), porém a média de alterações/caso foi maior no segundo grupo, indicando que tais casos apresentam um perfil de alterações genômicas mais instável.

A comparação entre os perfis de alterações genômicas de acordo com comprometimento linfonodal, estadiamento e evolução da doença apresentou quadros semelhantes. Casos apresentando metástase linfonodal, estádios mais avançados e morte por câncer apresentaram maior instabilidade cromossômica, caracterizado por um maior número de alterações e de média de alterações por caso.

A análise comparativa entre os perfis de alterações detectadas por aCGH, de acordo com fatores clínico-patológicos, mostrou que casos que apresentaram maior instabilidade cromossômica mostraram pior comportamento tumoral, como nível de infiltração tumoral mais profundo, presença de invasão linfática, comprometimento linfonodal, estadios mais avançados e pior prognóstico. Os mecanismos que levam à instabilidade cromossômica ainda não estão bem estabelecidos, mas há indícios de que alterações em genes responsáveis pela manutenção da integridade genômica como os envolvidos em reparos de DNA ou em *checkpoints* da fase mitótica da ciclo celular estejam atuando nesse processo (MARTIN et al. 2010). Acredita-se que a instabilidade cromossômica promove o desenvolvimento tumoral à medida que alterações genômicas surgem em lesões pré-malignas e, um perfil genômico mais instável leva ao acúmulo de mutações em genes supressores de tumor e oncogenes, aumentando o potencial invasivo e metastático do tumor (DOAK 2008; BURRELL et al. 2010; MARTIN et al. 2010). A associação entre maior instabilidade cromossômica e comportamento tumoral mais invasivo tem sido relatada em outros tipos tumorais como em câncer no trato gastrointestinal (DOAK 2008) e de mama (ROSCHKE et al. 2008; BURRELL et al. 2010; SMID et al. 2010).

5.3 CGH ARRAY X HR-CGH

Foi realizada a comparação entre os resultados das análises por aCGH e HR-CGH, nos casos em que ambas as técnicas foram utilizadas

(nove casos). Para essa comparação, os dados de aCGH foram gerados utilizando dois diferentes *thresholds*, um mais restritivo de 6.0; e outro mais abrangente, de 5.0.

Na primeira análise, utilizando o *threshold* 6.0, o número de alterações detectadas por aCGH (113 alterações) foi consideravelmente inferior ao identificado pela técnica de HR-CGH (409 alterações). No entanto, as porcentagens de concordância entre as alterações em regiões mínimas comuns identificadas por aCGH e por HR-CGH foi de 66,7% e de 77,7% para ganhos e perdas, respectivamente. A análise comparativa utilizando dados de aCGH gerados utilizando *threshold* de 5.0 mostrou um maior número de alterações (233 alterações). No entanto, a porcentagem de concordância entre as alterações em regiões mínimas comuns foi de 35,3% para ganhos e de 47% para perdas genômicas, indicando que muitas das alterações detectadas não foram consistentes com dados de HR-CGH. Embora o número de alterações detectadas utilizando o *threshold* 6.0 seja menor, tais dados sugerem que o uso de um *threshold* mais restritivo permite uma detecção mais seletiva das alterações genômicas, sendo os resultados obtidos aparentemente mais confiáveis.

A análise comparativa entre os resultados das análises de aCGH e HR-CGH nos nove casos pareados mostraram que muitas das alterações genômicas detectadas pela técnica de aCGH foram consistentes com as regiões identificadas pela técnica de HR-CGH. Adicionalmente, utilizando a técnica de aCGH, foi possível detectar alterações menores que não puderam ser detectadas pelo método de CGH cromossômico. Isso pode ser devido a

limitação da técnica de HR-CGH em detectar alterações genômicas em menor resolução (KALLIONIEMI et al. 1993; BRYNDORF et al. 1995; INAZAWA et al. 2004), o que é superado pelo método de aCGH (SNIJDERS et al. 2003; HUGHES et al. 2004; SHIH IE e WANG 2005; BEJJANI e SHAFFER 2006).

O número de alterações genômicas detectadas pela técnica de HR-CGH foi superior quando comparado ao encontrado por aCGH. Pela técnica de HR-CGH, a análise de alterações nas seqüências de DNA é realizada pela hibridação *in situ* fluorescente em que o DNA genômico total isolado das amostras testes e referência são submetidos a uma hibridação competitiva em cromossomos metafásicos normais. Ou seja, por esta metodologia, todo o genoma, incluindo regiões codificadoras e não codificadoras é alvo da hibridação para a detecção de ganhos e perdas no DNA teste em comparação ao DNA referência. Por sua vez, pela técnica de aCGH, plataformas contendo seqüências de DNA conhecidas e previamente selecionadas são utilizadas como alvo para a hibridação competitiva entre os DNA tumoral e o DNA controle, reduzindo a análise somente para tais seqüência. Dessa forma, a detecção de regiões cromossômicas envolvidas em alterações genômicas por HR-CGH, mas que não foram identificadas por aCGH, podem ser devido a ausência de tais regiões na plataforma utilizada pela segunda metodologia. Contudo, tal limitação poderia ser solucionada utilizando uma plataforma com maior número de seqüências a serem avaliadas, já disponíveis comercialmente.

Por outro lado, pode-se também supor que muitas alterações genômicas tenham sido decorrentes do processo de amplificação das amostras FFEP por métodos baseados em PCR, diferentemente das amostras a fresco utilizadas por aCGH. Além disso, deve-se considerar que subpopulações tumorais diferentes foram avaliadas pelos dois métodos gerando perfis genômicos distintos, uma vez que fragmentos de regiões distintas da peça cirúrgica foram retiradas para serem congeladas ou para serem processadas em blocos de parafina. Entretanto, apesar das discrepâncias observadas, foi detectado um padrão aceitável de similaridade entre as duas análises para os mesmos tumores.

5.4 GENES DE INTERESSE

Neste estudo, foram identificados 727 genes mapeados em regiões mínimas comuns mais freqüentemente alteradas em casos de CEE, detectadas por aCGH. Muitos desses genes estão envolvidos em importantes processos celulares, como regulação do ciclo celular e apoptose, fatores de crescimento, adesão celular, entre outros, desempenhando um papel importante na tumorigênese e progressão tumoral.

A amplificação de 11q13 tem sido detectada em diversos tipos tumorais, como câncer de cabeça e pescoço (FREIER et al. 2006; JIN et al. 2006; CLARK et al. 2009), de bexiga (ZAHARIEVA et al. 2003) e mama (DANCAU et al. 2010). Em CEE, relatos de alterações envolvendo ganhos

genômicos detectados por aCGH em 11q13.2-q13.3 são recorrentes em literatura (ISHIZUKA et al. 2002; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008). Ganhos nessa região também foram detectados por HR-CGH no presente estudo, em concordância com dados de literatura previamente descritos (TADA et al. 2000; YEN et al. 2001; UENO et al. 2002; NOGUCHI et al. 2003; SHIOMI et al. 2003; YEN et al. 2003; KWONG et al. 2004; WANG et al. 2006; SUGIMOTO et al. 2007; QIN et al. 2008), indicando que essa região desempenha importante papel no desenvolvimento tumoral. Adicionalmente, no presente estudo, foi verificada associação significativa entre ganhos em 11q13.2 e presença de invasão linfática, sugerindo que genes mapeados nessa região conferem um comportamento mais invasivo ao tumor.

Dentre os genes mapeados nestas regiões, encontram-se alguns envolvidos com o controle do ciclo celular (*CCND1*), fatores de crescimento (*FGF19*, *FGF4*, *FGF3*), receptor da via de sinalização Wnt (*LRP5*) e adesão celular (*CTTN*).

A perda da regulação do ciclo celular é uma constante em neoplasias malignas, devido a alterações relacionadas às proteínas associadas à regulação do ciclo celular, como as ciclinas. As ciclinas ativam periodicamente as moléculas de CDKs (do inglês, *cyclin-dependent kinase*), formando complexos ciclina/CDK, que atuam em diferentes fases do ciclo celular. A ciclina D1, codificada pelo gene *CCND1*, atua como um sensor mitogênico, sendo um dos reguladores do ciclo celular mais freqüentemente alterados em câncer. Essa proteína liga-se a moléculas de CDK4/6 e os

complexos formados são necessários para o início da fase G1 (MURRAY 2004). Acredita-se que a ciclina D1 esteja envolvida na fosforilação e inativação de pRb (proteína retinoblastoma), o que causa a liberação de fatores de transcrição da família E2F do complexo com pRb, permitindo a transcrição de genes necessários para a fase S, como a ciclina E e A (FU et al. 2004; DESHPANDE et al. 2005). Desse modo, alterações nesse mecanismo podem levar à proliferação descontrolada das células (MURRAY 2004; DESHPANDE et al. 2005).

É freqüente o aumento da expressão de ciclina D1 em vários tipos tumorais, o que pode ser atribuído a vários mecanismos como alterações genômicas, regulação pós-transcricional e estabilização protéica pós-traducional (KIM e DIEHL 2009). A ocorrência de ganhos genômicos na região envolvendo o gene *CCND1* tem sido freqüentemente descrita por outros autores em análises por aCGH (ISHIZUKA et al. 2002; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008), indicando que tal gene desempenha um importante papel no desenvolvimento tumoral. Vários estudos relatam a presença de amplificação de *CCND1* e aumento da expressão protéica em CEE (NAKAGAWA et al. 1995; SHINOZAKI et al. 1996; TAKEUCHI et al. 1997; MORGAN et al. 1999; SARBIA et al. 1999; 2001; GUNER et al. 2003; LIN et al. 2004; WU et al. 2004). Além disso, outros autores descreveram associações com pior prognóstico (TAKEUCHI et al. 1997; 2001) e metástase linfonodal (SARBIA et al. 1999).

Na região 11q13.3, encontram-se mapeados três genes da família de fatores de crescimento do fibroblasto *FGF19*, *FGF4*, *FGF3* (do inglês,

fibroblast growth factor). Corroborando os dados aqui apresentados, ganhos genômicos envolvendo os genes *FGF3* e *FGF4* em CEE foram relatados por alguns autores em estudos prévios (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; HIRASAKI et al. 2007; CARNEIRO et al. 2008). Para o nosso conhecimento, não há relatos sobre alterações envolvendo o gene *FGF19* em CEE. Entretanto, a análise de expressão das proteínas codificadas por tais genes tem sido descrita em alguns tumores como *FGF3* em carcinoma hepatocelular (HU et al. 2007) e carcinoma de pulmão (TAI et al. 2006), *FGF4* em sarcoma de Kaposi (KIURU-KUHLEFELT et al. 2000) e *FGF19* em carcinoma colorretal (PAI et al. 2008). Em CEE, existem relatos de ocorrência de co-amplificação de *FGF3* e *FGF4* (TSUDA et al. 1989), co-amplificação de *CCND1* e *FGF3* (SHIMADA et al. 1997) e amplificação somente de *FGF3* (IKEDA et al. 1996; SUZUKI et al. 1997).

A família FGF é composta por 22 membros (FGF1-14, FGF16-23), responsáveis pela codificação de proteínas que atuam na sinalização de processos como proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (POWERS et al. 2000; GROSE e DICKSON 2005). Essas proteínas sinalizam através de receptores tirosina-quinase, sendo conhecidos até o momento FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4 (do inglês, *fibroblast growth factor receptor*). A transdução do sinal de FGF pode ocorrer pelas vias de sinalização PI3K-AKT, Ras-MAPK e PLC γ (KATOH 2006; TURNER e GROSE 2010). Há indícios de que a cascata de sinalização RAS-MAPK esteja envolvida em crescimento e diferenciação celular e a via PI3K-AKT, em sobrevivência celular (KATOH 2006). Adicionalmente, acredita-se que a

via de sinalização FGF dependente de PI3K-AKT interfere na via de sinalização Wnt (KATOH 2007).

A perda da regulação da via de sinalização Wnt é considerada um importante evento que pode levar ao desencadeamento do início e progressão de diversos tumores, pela alteração de processos como proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão celular, além de polaridade e migração celular e metástase (KATOH 2006; LAI et al. 2009). A transdução de sinais pela via Wnt pode ocorrer pela via canônica ou pela via não-canônica, sendo que a primeira, também conhecida como via Wnt/ β -catenina, é a mais estudada (LAI et al. 2009). Resumidamente, essa via é ativada quando um ligante Wnt liga-se ao receptor transmembrânico *Frizzled* e ao seu co-receptor LRP6 ou LRP5 (do inglês, *low-density-lipoprotein receptor related protein*). A formação do complexo Wnt-Frizzled-LRP6/5 leva ao recrutamento da proteína Dishevelled (Dvl), resultando na fosforilação de LRP6/5 e no recrutamento do complexo axina aos receptores. O complexo LRP6/5-axina induz a inibição da fosforilação de β -catenina, liberando-a de seu acoplamento a GSK3 β . Na ausência da sinalização da via canônica, a β -catenina encontra-se acoplada e fosforilada por GSK3 β , sinalizando para ubiquitinação e posterior degradação por proteossomos. O desacoplamento de β -catenina de seu complexo com GSK3 β leva à estabilização de β -catenina, que se acumula no núcleo, onde se acopla aos fatores de transcrição TCF/LEF (do inglês, *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*), ativando a expressão de genes alvos da via de sinalização Wnt, como

FGF18, *FGF20*, *MYC* e *CCND1* (KATOH 2006; KATOH 2007; LAI et al. 2009; MACDONALD et al. 2009).

A perda da regulação da via de sinalização Wnt tem sido estudada em diversos tipos tumorais, incluindo o carcinoma de mama (HOWE e BROWN 2004; GEBESHUBER et al. 2007; ZARDAWI et al. 2009), de cabeça e pescoço (DIAZ PRADO et al. 2009; MOLINOLO et al. 2009), hepatocelular (TAKIGAWA e BROWN 2008), de pulmão (YAGUI-BELTRAN e JABLONS 2009), gástrico (KOLLIGS et al. 2002; WU et al. 2010) e esôfago (DENG et al. 2007; SALAHSHOR et al. 2008).

No presente estudo, genes responsáveis pela codificação de alguns componentes da via de sinalização Wnt foram identificados em regiões envolvidas em alterações genômicas detectadas por aCGH. O gene codificador do co-receptor LRP5 encontra-se mapeado em 11q13.2, envolvida em ganho genômico detectado tanto por aCGH quanto por HR-CGH. O gene *DVL3*, responsável pela codificação da proteína Dishvelled 3, foi identificado na região 3q27.1 envolvida em ganho genômico neste estudo. O gene *CCND1*, considerado um dos genes alvo da via de sinalização Wnt, encontra-se mapeado em 11q13.2, como mencionado anteriormente. Com exceção de *CCND1*, não temos conhecimento de alterações envolvendo os genes *LRP5* e *DVL3* em CEE.

A presença de metástase linfonodal e infiltração de órgãos adjacentes tem sido considerada como um importante fator que influencia na falha ao tratamento aplicado a casos de CEE (KUWANO et al. 2003; ROSAI 2004; RIZK et al. 2006; ZHANG et al. 2010). Por essa razão, as moléculas de

adesão tem sido alvo de crescente interesse, uma vez que a cascata de eventos que podem levar ao desenvolvimento de metástases inicia-se com a perda da regulação na interação entre adesão célula-célula e célula-matriz, permitindo o destacamento das células neoplásicas de seus sítios tumorais primários (NAIR et al. 2005; LEBER e EFFERTH 2009).

Alterações nas propriedades de adesão celular e degradação da matriz extracelular são necessárias para a motilidade e migração celular através dos tecidos e, conseqüentemente, para invasão tumoral e desenvolvimento de metástases (AMMER e WEED 2008). Os processos de migração celular e invasão requerem a regulação do citoesqueleto de actina cortical, utilizando uma rede de proteínas sinalizadoras que coordena mudanças na arquitetura da actina (AMMER e WEED 2008).

A cortactina tem sido relatada como componente de estruturas celulares envolvidas em motilidade celular, como protusões da membrana celular baseadas em actina como lamelapódio, filapódio, podossomos e invadopodia (DALY 2004; AMMER e WEED 2008). Essa proteína é ativada por fosforilação por tirosina e serina/treonina quinases, em resposta a estímulos extracelulares, como os induzidos por Src mediados por fatores de crescimento (WEED e PARSONS 2001; AMMER e WEED 2008). Quando inativa, a cortactina encontra-se dispersa no citoplasma, mas após sua fosforilação, essa proteína liga-se e ativa o complexo de proteína Arp2/3 (do inglês, *actin-related protein 2/3*), estabilizando-o em filamentos de actina (F-actin) pré-existentes e induzindo a formação de um sítio de nucleação para a produção de novos filamentos. Dessa forma, cortactina é capaz de

influenciar diretamente a polimerização de actina, agindo como um fator promotor de nucleação (NPF - do inglês, *nucleation promoting factor*) para Arp2/3 (WEAVER et al. 2001; WEED e PARSONS 2001; DALY 2004; WEAVER 2008).

A cortactina é codificada pelo gene *CTTN*, que está mapeado no amplicon 11q13 e encontra-se amplificado em tumores como em mama e em cabeça e pescoço (WEAVER 2008). Em CEE, concordando com os dados aqui apresentados, ganhos genômicos envolvendo o gene *CTTN* já foram descritos por vários autores (ISHIZUKA et al. 2002; ARAI et al. 2003; KIM et al. 2006; HIRASAKI et al. 2007).

O aumento de expressão da proteína é freqüentemente relatado em vários tumores como em câncer gástrico (WANG et al. 2010), colorretal (HIRAKAWA et al. 2009; CAI et al. 2010), de mama (DEDES et al. 2010) e de cabeça e pescoço (CLARK et al. 2009; YAMADA et al. 2010) e sua expressão parece conferir um potencial metastático aos tumores (WEED e PARSONS 2001). Estudos prévios têm relatado aumento da expressão de cortactina em CEE, indicando associação entre a expressão dessa proteína e pior prognóstico (HSU et al. 2008; HSU et al. 2009). Em análise utilizando RNAi, LUO et al. (2006) mostrou que ausência de expressão de *CTTN* diminui o crescimento tumoral e a capacidade metastática (LUO et al. 2006; LUO e WANG 2007).

A manutenção da arquitetura epitelial ocorre pela ação conjunta das *tight junctions*, das junções aderentes e dos desmossomos. A adesão celular entre células adjacentes é mantida pelas junções aderentes e os

desmossomos, pela ação de proteínas como E-caderina, desmocolina e desmogleína (NAIR et al. 2005; CHIDGEY e DAWSON 2007; LIONI et al. 2007). Genes responsáveis pela codificação de tais proteínas encontram-se mapeados no cromossomo 18, em regiões envolvidas em perdas genômicas detectadas no presente estudo.

Membros do grupo das caderinas *CDH2* (18q12.1), *CDH7*, *CDH19* e *CDH20* (18q22-q23) foram identificadas no presente estudo, envolvidas em perdas genômicas. As caderinas são glicoproteínas de adesão célula-célula cálcio-dependentes, que desempenham papel na formação e manutenção tecidual durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção de arquitetura e função de tecidos adultos (OKEGAWA et al. 2004; CHRISTIANSEN e RAJASEKARAN 2006). Alterações em suas funções tem sido associadas a progressão tumoral (OKEGAWA et al. 2004).

Existem poucos dados em literatura sobre *CDH2* (N-caderina), *CDH7* (caderina-7), *CDH19* (caderina-19) e *CDH20* (caderina-20) e câncer. Em estudo realizado em camundongos e em linhagens celulares de melanoma e de melanócitos humanos, foi relatado que a caderina-20 atua apenas durante a embriogênese e, a expressão de caderina-7 e N-caderina estão envolvidas na oncogênese (MOORE et al. 2004). Há evidências de que ocorre aumento da expressão de N-caderina em células tumorais, aumentando sua afinidade com células estromais, aumentando a migração celular (LEBER e EFFERTH 2009). Dentre tais genes, apenas a proteína N-caderina, codificada pelo gene *CDH2*, tem sido avaliada em CEE. Porém, inversamente ao encontrado neste estudo, Li et al. (2009) mostraram que o

aumento na expressão de N-caderina está associado a invasão e diferenciação celular e metástase linfonodal (LI et al. 2009).

Embora as alterações envolvendo perdas em regiões onde estão mapeados os genes *CDH2*, *CDH7*, *CDH19* e *CDH20* tenham sido detectadas tanto por HR-CGH e por acGH no presente estudo, os dados resultantes do presente trabalho não forneceram informações que possam ajudar na elucidação do papel das caderinas aqui identificadas em CEE. Devido a baixa frequência em que foram detectadas as alterações envolvendo os genes da família das caderinas, análises adicionais incluindo um maior número de casos são necessárias para avaliar a importância de tais genes em CEE.

Os desmossomos são complexas junções intercelulares que atuam na adesão celular, desempenhando importante função na manutenção da arquitetura tecidual (CHIDGEY 2002). Essas junções são constituídas por proteínas pertencentes à três famílias de genes, as caderinas desmossomais, armadillo e plaquinas (CHIDGEY e DAWSON 2007). As caderinas desmossomais, conhecidos como desmogleína e desmocolina, são moléculas de adesão Ca^{2+} -dependentes, responsáveis pela estrutura transmembrânica do desmossomo (GARROD e CHIDGEY 2008). A família das caderinas demossomais consiste de três desmocolinas (*DSC1*, *DSC2* e *DSC3*) e quatro desmogleínas (*DSG1*, *DSG2*, *DSG3* e *DSG4*)(DUSEK et al. 2007). Cada estrutura desmossomal apresenta, pelo menos, um representante de cada proteína (CHIDGEY e DAWSON 2007). Há indícios de que a perda de expressão de desmocolinas e desmogleínas leva a

liberação de β -catenina das junções aderentes, causando um aumento da sinalização pela via Wnt/ β -catenina (CHIDGEY e DAWSON 2007).

A perda de seqüências do cromossomo 18, onde encontra-se mapeado o cluster dos genes *DSC* e *DSG* tem sido relatada em câncer de esôfago e cabeça e pescoço (CHIDGEY 2002). Neste estudo, em concordância com tais dados, foram detectadas perdas genômicas em 18q12.1, envolvendo todos os genes responsáveis pela codificação das desmogleínas e desmocolinas. A expressão de desmogleína tem sido avaliada em CEE (PITTELLA et al. 2001) e a perda de expressão protéica de desmogleína-1 pode ser um potencial marcador preditivo de metástase linfonodal e de outros órgãos (NATSUGOE et al. 1994; NAKANO et al. 1998; NAKASHIMA et al. 2002).

O CEE é conhecido por seu comportamento agressivo, e apesar do desenvolvimento dos diversos tipos de terapia e cirurgia, ainda observa-se uma alta taxa de mortalidade após tratamento cirúrgico (FUJITA et al. 1995; NAKAGAWA et al. 2004; TACHIBANA et al. 2005). Portanto, é importante conhecer as características moleculares dos tumores, identificando marcadores que possam auxiliar na escolha do melhor tratamento além de permitir o desenvolvimento de terapias-alvo moleculares, que sejam mais efetivas em CEE.

A análise por HR-CGH e por aCGH é considerada uma importante ferramenta para detecção de alterações envolvidas em ganhos e perdas genômicas. Para o nosso conhecimento, no Brasil, não há um estudo descrevendo alterações genômicas em CEE por CGH cromossômico e CGH

array e, conseqüentemente, não há relatos sobre a associação de tais alterações com processos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral em CEE de pacientes brasileiros. Alterações genômicas recorrentes foram identificadas no presente trabalho, concordando com dados relatados por estudos prévios. Além disso, várias alterações foram descritas como recorrentes entre as amostras, sugerindo seu envolvimento em CEE. Algumas das alterações aqui descritas, associadas a fatores clínico-patológicos, estão em concordância com dados em literatura, indicando que tais regiões desempenham funções importantes na tumorigênese em CEE. Além disso, a identificação de tais alterações pode ser considerada um ponto de partida para a identificação de possíveis genes de interesse, que possam desempenhar importante função no desenvolvimento e progressão tumoral. Além disso, tais análises poderiam contribuir com dados em literatura e auxiliar na identificação de possíveis fatores indicadores de prognóstico, os quais poderiam ser utilizados para escolha da melhor conduta terapêutica em casos de CEE em nosso país.

A partir dos dados aqui apresentados, estudos futuros envolvendo análise de expressão gênica e protéica em uma casuística maior deverão ser realizados para confirmar os achados e contribuir para a determinação de fatores prognósticos que possam estar atuando do desenvolvimento e progressão dos CEE e assim, ajudar na escolha do melhor alternativa terapêutica nestes tumores.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, foram identificadas alterações do número de cópias do DNA em todos os casos de CEE avaliados, utilizando as técnicas de HR-CGH e CGH *array*, sendo que muitas de tais alterações estão de acordo com dados já descritos em literatura.

1) Associações entre algumas alterações genômicas detectadas por HR-CGH e aCGH e variáveis clínico-patológicas foram identificadas:

- HR-CGH:
 - Maior frequência de perdas em 13q31 em casos com comprometimento linfonodal;
 - Ganhos em 1q22-q23 e em 6q21 e perdas em 19q13.1 e em 19q13.2 foram mais frequentes em tumores mais diferenciados;
- aCGH: apenas ganhos em 11q13.2 mostrou associação significativa com invasão linfática, sendo mais frequentes em casos que apresentaram a invasão.

Tais dados sugerem que genes mapeados nestas regiões podem estar envolvidos em eventos mais tardios durante a progressão tumoral e conferindo maior agressividade a esses tumores. Aproximadamente 730 genes mapeiam-se nas regiões que estavam envolvidos em alterações genômicas detectadas por aCGH. Dentre eles, encontram-se genes envolvidos em diversos processos como adesão celular, proliferação e

diferenciação celular, além de oncogenes, supressores de tumor e fatores de transcrição.

2) A comparação do perfil de alterações genômicas detectadas por aCGH em casos de CEE, de acordo com variáveis clínico-patológicas mostrou que a presença de maior número de alterações foi mais freqüente em casos com comportamento mais invasivo, sugerindo que padrões genômicos mais complexos conferem um potencial mais invasivo aos tumores.

3) Na comparação entre os dados resultantes das análises por HR-CGH e por aCGH, a porcentagem de concordância entre as alterações detectadas por ambas as metodologias foi maior quando o valor de *threshold* 6.0 foi utilizado, indicando que o uso de um valor mais restritivo permite uma detecção mais seletiva das alterações genômicas. Embora as duas metodologias apresentem diferenças consideráveis, foi observada a presença de alterações genômicas comuns que podem ser consideradas como relevantes ao processo tumoral de esôfago.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymous]. Prognostic significance of CyclinD1 and E-Cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma: multiinstitutional retrospective analysis. Research Committee on Malignancy of Esophageal Cancer, Japanese Society for Esophageal Diseases. **J Am Coll Surg** 2001; 192:708.

Akervall J. Gene profiling in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Metastasis Rev** 2005; 24:87-94.

Akervall J. Genomic screening of head and neck cancer and its implications for therapy planning. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2006; 263:297-304.

Ammer AG, Weed SA. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. **Cell Motil Cytoskeleton** 2008; 65:687-707.

Andre F, Job B, Dessen P, et al. Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. **Clin Cancer Res** 2009; 15:441-51.

Arai H, Ueno T, Tangoku A, et al. Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 146:16-21.

Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. **J Mol Diagn** 2006; 8:528-33.

Bergamo NA, Rogatto SR, Poli-Frederico RC, et al. Comparative genomic hybridization analysis detects frequent over-representation of DNA

sequences at 3q, 7p, and 8q in head and neck carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 119:48-55.

Bernardini M, Weberpals J, Squire JA. The use of cytogenetics in understanding ovarian cancer. **Biomed Pharmacother** 2004; 58:17-23.

Bird-Lieberman EL, Fitzgerald RC. Early diagnosis of oesophageal cancer. **Br J Cancer** 2009; 101:1-6.

Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. **Am J Hum Genet** 1995; 57:1211-20.

Burrell RA, Juul N, Johnston SR, et al. Targeting chromosomal instability and tumour heterogeneity in HER2 positive breast cancer. **J Cell Biochem** 2010;

Cai JH, Zhao R, Zhu JW, et al. Expression of cortactin correlates with a poor prognosis in patients with stages II-III colorectal adenocarcinoma. **J Gastrointest Surg** 2010; 14:1248-57.

Carneiro A, Isinger A, Karlsson A, et al. Prognostic impact of array-based genomic profiles in esophageal squamous cell cancer. **BMC Cancer** 2008; 8:98.

Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, et al. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **Int.J.Cancer** 2000; 88:658.

Chidgey M. Desmosomes and disease: an update. **Histol Histopathol** 2002; 17:1179-92.

Chidgey M, Dawson C. Desmosomes: a role in cancer? **Br J Cancer** 2007; 96:1783-7.

Choi YW, Bae SM, Kim YW, et al. Gene expression profiles in squamous cell cervical carcinoma using array-based comparative genomic hybridization analysis. **Int J Gynecol Cancer** 2007; 17:687-96.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res** 2006; 66:8319-26.

Clark ES, Brown B, Whigham AS, et al. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. **Oncogene** 2009; 28:431-44.

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

Dancau AM, Wuth L, Waschow M, et al. PPF1A1 and CCND1 are frequently coamplified in breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:1-8.

de Smith AJ, Tsalenko A, Sampas N, et al. Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. **Hum Mol Genet** 2007; 16:2783-94.

De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, et al. Food groups and risk of squamous cell carcinoma of the oesophagus: a case-control study in Uruguay. **Br.J.Cancer** 2003; 89:1209.

Dedes KJ, Lopez-Garcia MA, Geyer FC, et al. Cortactin gene amplification and expression in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemical study. **Breast Cancer Res Treat** 2010;

Deng YZ, Chen PP, Wang Y, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenicity through beta-catenin-T-cell factor/Lef signaling. **J Biol Chem** 2007; 282:36571-81.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene** 2005; 24:2909-15.

Diaz Prado SM, Medina Villaamil V, Aparicio Gallego G, et al. Expression of Wnt gene family and frizzled receptors in head and neck squamous cell carcinomas. **Virchows Arch** 2009; 455:67-75.

Dietz J, Pardo SH, Furtado CD, Harzheim E, Furtado AD. [Risk factors related to esophageal cancer in Rio Grande do Sul, Brazil]. **Rev Assoc Med Bras** 1998; 44:269-72.

Doak SH. Aneuploidy in upper gastro-intestinal tract cancers--a potential prognostic marker? **Mutat Res** 2008; 651:93-104.

Dusek RL, Godsel LM, Green KJ. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. **J Dermatol Sci** 2007; 45:7-21.

Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1404-13.

Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. **GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. ; 2008. <http://globocan.iarc.fr>

Freier K, Knoepfle K, Flechtenmacher C, et al. Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in

oral squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:9-16.

Freier K, Sticht C, Hofele C, et al. Recurrent coamplification of cytoskeleton-associated genes EMS1 and SHANK2 with CCND1 in oral squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:118-25.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology** 2004; 145:5439-47.

Fujita H, Kakegawa T, Yamana H, et al. Mortality and morbidity rates, postoperative course, quality of life, and prognosis after extended radical lymphadenectomy for esophageal cancer. Comparison of three-field lymphadenectomy with two-field lymphadenectomy. **Ann Surg** 1995; 222:654-62.

Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1778:572-87.

Gebeshuber CA, Sladeczek S, Grunert S. Beta-catenin/LEF-1 signalling in breast cancer--central players activated by a plethora of inputs. **Cells Tissues Organs** 2007; 185:51-60.

Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. **Cytokine Growth Factor Rev** 2005; 16:179-86.

Guner D, Sturm I, Hemmati P, et al. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. **Int J Cancer** 2003; 103:445.

Hirakawa H, Shibata K, Nakayama T. Localization of cortactin is associated with colorectal cancer development. **Int J Oncol** 2009; 35:1271-6.

Hirasaki S, Noguchi T, Mimori K, et al. BAC clones related to prognosis in patients with esophageal squamous carcinoma: an array comparative genomic hybridization study. **Oncologist** 2007; 12:406-17.

Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. **Cancer Biol Ther** 2004; 3:36-41.

Hsu KF, Lin CK, Yu CP, et al. Cortactin, fascin, and survivin expression associated with clinicopathological parameters in esophageal squamous cell carcinoma. **Dis Esophagus** 2009; 22:402-8.

Hsu NY, Yeh KT, Chiang IP, et al. Cortactin overexpression in the esophageal squamous cell carcinoma and its involvement in the carcinogenesis. **Dis Esophagus** 2008; 21:402-8.

Hu L, Sham JS, Xie D, et al. Up-regulation of fibroblast growth factor 3 is associated with tumor metastasis and recurrence in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett** 2007; 252:36-42.

Hughes S, Lim G, Beheshti B, et al. Use of whole genome amplification and comparative genomic hybridisation to detect chromosomal copy number alterations in cell line material and tumour tissue. **Cytogenet Genome Res** 2004; 105:18-24.

Ikeda Y, Ozawa S, Ando N, et al. Meanings of c-erbB and int-2 amplification in superficial esophageal squamous cell carcinomas. **Ann Thorac Surg** 1996; 62:835-8.

Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. **Cancer Sci** 2004; 95:559-63.

Ishizuka T, Tanabe C, Sakamoto H, et al. Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 296:152-5.

Jin C, Jin Y, Gisselsson D, et al. Molecular cytogenetic characterization of the 11q13 amplicon in head and neck squamous cell carcinoma. **Cytogenet Genome Res** 2006; 115:99-106.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. **Semin Cancer Biol** 1993; 4:41-6.

Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung. **BMC Cancer** 2009; 9:237.

Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. **Cancer Biol Ther** 2006; 5:1059-64.

Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). **Int J Oncol** 2006; 29:163-8.

Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4042-5.

Kim DH, Muto M, Kuwahara Y, et al. Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells. **Oncol Rep** 2006; 16:1053-9.

Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. **J Cell Physiol** 2009; 220:292-6.

Kiuru-Kuhlefelt S, Sarlomo-Rikala M, Larramendy ML, et al. FGF4 and INT2 oncogenes are amplified and expressed in Kaposi's sarcoma. **Mod Pathol** 2000; 13:433-7.

Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:4494-9.

Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. **Digestion** 2002; 66:131-44.

Ku GY, Ilson DH. Preoperative therapy for esophageal cancer. **Gastroenterol Clin North Am** 2009; 38:135-52, ix.

Kuwano H, Nakajima M, Miyazaki T, Kato H. Distinctive clinicopathological characteristics in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Thorac Cardiovasc Surg** 2003; 9:6-13.

Kwong D, Lam A, Guan X, et al. Chromosomal aberrations in esophageal squamous cell carcinoma among Chinese: gain of 12p predicts poor prognosis after surgery. **Hum Pathol** 2004; 35:309-16.

Lai SL, Chien AJ, Moon RT. Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. **Cell Res** 2009; 19:532-45.

Lambert R, Hainaut P. Esophageal cancer: cases and causes (part I). **Endoscopy** 2007; 39:550-5.

Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). **Int J Oncol** 2009; 34:881-95.

Li K, Wang X, He W, Lin N, Fan QX. Expression of N-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma and silencing expression of N-cadherin using RNA interference on invasiveness of EC9706 cells. **Ai Zheng** 2009; 28:8-13.

Li M, Pinkel D. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. **J Zhejiang Univ Sci B** 2006; 7:162-3.

Lin YC, Wu MY, Li DR, Wu XY, Zheng RM. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2004; 10:3235.

Lioni M, Brafford P, Andl C, et al. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. **Am J Pathol** 2007; 170:709-21.

Liu W, Zhang X, Sun W. Developments in treatment of esophageal/gastric cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2008; 9:375-87.

Luo ML, Shen XM, Zhang Y, et al. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. **Cancer Res** 2006; 66:11690-9.

Luo ML, Wang MR. CTTN (EMS1): an oncogene contributing to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. **Cell Res** 2007; 17:298-300.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell** 2009; 17:9-26.

Martin SA, Hewish M, Lord CJ, Ashworth A. Genomic instability and the selection of treatments for cancer. **J Pathol** 2010; 220:281-9.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, et al. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol** 2009; 45:324-34.

Moore R, Champeval D, Denat L, et al. Involvement of cadherins 7 and 20 in mouse embryogenesis and melanocyte transformation. **Oncogene** 2004; 23:6726-35.

Morgan RJ, Newcomb PV, Hardwick RH, Alderson D. Amplification of cyclin D1 and MDM-2 in oesophageal carcinoma. **Eur J Surg Oncol** 1999; 25:364.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. **Cell** 2004; 116:221.

Nair KS, Naidoo R, Chetty R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. **J Clin Pathol** 2005; 58:343-51.

Nakagawa H, Zukerberg L, Togawa K, et al. Human cyclin D1 oncogene and esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer** 1995; 76:541.

Nakagawa S, Kanda T, Kosugi S, et al. Recurrence pattern of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus after extended radical esophagectomy with three-field lymphadenectomy. **J Am Coll Surg** 2004; 198:205-11.

Nakamura Y, Migita T, Hosoda F, et al. Kruppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. **Int J Cancer** 2009; 125:1859-67.

Nakano S, Baba M, Natsugoe S, et al. Detection of lymph node metastasis using desmoglein 1 expression in superficial esophageal cancer in relation to the endoscopic mucosal resection. **Dis Esophagus** 1998; 11:157-61.

Nakashima S, Natsugoe S, Matsumoto M, et al. Biological properties of biopsy specimens are useful for predicting lymph node micrometastasis in esophageal carcinoma. **Anticancer Res** 2002; 22:2951-6.

Natsugoe S, Aikou T, Shimada M, et al. Expression of desmoglein I in squamous cell carcinoma of the esophagus. **J Surg Oncol** 1994; 57:105-10.

Niini T, Lopez-Guerrero JA, Ninomiya S, et al. Frequent deletion of CDKN2A and recurrent coamplification of KIT, PDGFRA, and KDR in fibrosarcoma of bone--an array comparative genomic hybridization study. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:132-43.

Noguchi T, Kimura Y, Takeno S, et al. Chromosomal imbalance in esophageal squamous cell carcinoma: 3q gain correlates with tumor progression but not prognostic significance. **Oncol Rep** 2003; 10:1393-400.

Ojopi EP, Cavalli LR, Cavalieri LM, Squire JA, Rogatto SR. Comparative genomic hybridization analysis of benign and invasive male breast neoplasms. **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 134:123-6.

Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta Biochim Pol** 2004; 51:445-57.

Or YY, Chung GT, To KF, et al. Identification of a novel 12p13.3 amplicon in nasopharyngeal carcinoma. **J Pathol** 2010; 220:97-107.

Pai R, Dunlap D, Qing J, et al. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. **Cancer Res** 2008; 68:5086-95.

Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. **Nat Genet** 2005; 37 Suppl:S11-7.

Pittella F, Katsube K, Takemura T, et al. Perinuclear and cytoplasmic distribution of desmoglein in esophageal squamous cell carcinomas. **Pathol Res Pract** 2001; 197:85-91.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocr Relat Cancer** 2000; 7:165-97.

Qin YR, Wang LD, Fan ZM, Kwong D, Guan XY. Comparative genomic hybridization analysis of genetic aberrations associated with development of esophageal squamous cell carcinoma in Henan, China. **World J Gastroenterol** 2008; 14:1828-35.

Redon R, Muller D, Caulee K, et al. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. **Cancer Res** 2001; 61:4122-9.

Ribeiro Pinto LF, Teixeira Rossini AM, Albano RM, et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. **Mutat Res** 2003; 544:365-73.

Rizk N, Venkatraman E, Park B, et al. The prognostic importance of the number of involved lymph nodes in esophageal cancer: implications for revisions of the American Joint Committee on Cancer staging system. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2006; 132:1374-81.

Rogatto S, Rainho, CA. **Citogenética sem risco: biossegurança e garantia de qualidade**. 1 ed. ed. FUNPEC; 2000. Citogenética Molecular; p.p. 143.

Rosai J. **Surgical pathology**. 9th ed. London: Mosby Elsevier; 2004. Gastrointestinal tract; p.615-47.

Roschke AV, Glebov OK, Lababidi S, et al. Chromosomal instability is associated with higher expression of genes implicated in epithelial-mesenchymal transition, cancer invasiveness, and metastasis and with lower expression of genes involved in cell cycle checkpoints, DNA repair, and chromatin maintenance. **Neoplasia** 2008; 10:1222-30.

Sakai N, Kjiyama Y, Iwanuma Y, et al. Study of abnormal chromosome regions in esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization: relationship of lymph node metastasis and distant metastasis to selected abnormal regions. **Dis Esophagus** 2009;

Salahshor S, Naidoo R, Serra S, et al. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. **Mod Pathol** 2008; 21:271-81.

Sarbia M, Stahl M, Fink U, et al. Prognostic significance of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with surgery alone or combined therapy modalities. **Int J Cancer** 1999; 84:86.

Sato-Kuwabara Y, Neves JI, Fregnani JH, Sallum RA, Soares FA. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. **BMC Cancer** 2009; 9:6.

Schoumans J, Nielsen K, Jeppesen I, et al. A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined size. **Eur J Hum Genet** 2004; 12:447-54.

Sewram V, De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in uruguay. **Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.** 2003; 12:508.

Shih le M, Wang TL. Apply innovative technologies to explore cancer genome. **Curr Opin Oncol** 2005; 17:33-8.

Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, et al. Genetic alterations in patients with esophageal cancer with short- and long-term survival rates after curative esophagectomy. **Ann Surg** 1997; 226:162-8.

Shinozaki H, Ozawa S, Ando N, et al. Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information. **Clin Cancer Res** 1996; 2:1155.

Shiomi H, Sugihara H, Kamitani S, et al. Cytogenetic heterogeneity and progression of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 147:50-61.

Smid M, Hoes M, Sieuwerts AM, et al. Patterns and incidence of chromosomal instability and their prognostic relevance in breast cancer subtypes. **Breast Cancer Res Treat** 2010;

Snijders AM, Pinkel D, Albertson DG. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. **Brief Funct Genomic Proteomic** 2003; 2:37-45.

Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nat Rev Genet** 2005; 6:782-92.

Squire JA, Bayani J, Luk C, et al. Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. **Head Neck** 2002; 24:874-87.

Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, et al. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. **Am J Pathol** 2002; 161:43-51.

Su M, Chin SF, Li XY, et al. Comparative genomic hybridization of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cell lines. **Dis Esophagus** 2006; 19:10-4.

Sugimoto T, Arai M, Shimada H, Hata A, Seki N. Integrated analysis of expression and genome alteration reveals putative amplified target genes in esophageal cancer. **Oncol Rep** 2007; 18:465-72.

Sugimoto T, Seki N, Shimizu S, et al. The galanin signaling cascade is a candidate pathway regulating oncogenesis in human squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:132-42.

Suzuki H, Abo S, Kitamura M, et al. Gene amplification of int-2 and erbB in human esophageal cancer: relationship to clinicopathological variables. **Cancer Invest** 1997; 15:411-5.

Tachibana M, Kinugasa S, Yoshimura H, et al. Clinical outcomes of extended esophagectomy with three-field lymph node dissection for esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Surg** 2005; 189:98-109.

Tada K, Oka M, Hayashi H, et al. Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to in vitro cell growth. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 117:108-12.

Tai AL, Sham JS, Xie D, et al. Co-overexpression of fibroblast growth factor 3 and epidermal growth factor receptor is correlated with the development of nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer** 2006; 106:146-55.

Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, et al. Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin Cancer Res** 1997; 3:2229.

Takigawa Y, Brown AM. Wnt signaling in liver cancer. **Curr Drug Targets** 2008; 9:1013-24.

Tan DS, Reis-Filho JS. Comparative genomic hybridisation arrays: high-throughput tools to determine targeted therapy in breast cancer. **Pathobiology** 2008; 75:63-74.

Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G, et al. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. **Cancer Res** 1989; 49:5505-8.

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:116-29.

Uchida M, Tsukamoto Y, Uchida T, et al. Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization. **J Pathol** 2010; 221:96-105.

Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, et al. Prediction of nodal metastasis by comparative genomic hybridization in biopsy specimens from patients with superficial esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2003; 9:5137-41.

Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, et al. Gain of 5p15 detected by comparative genomic hybridization as an independent marker of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2002; 8:526-33.

van Beers EH, Nederlof PM. Array-CGH and breast cancer. **Breast Cancer Res** 2006; 8:210.

Wang LD, Qin YR, Fan ZM, et al. Comparative genomic hybridization: comparison between esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardia adenocarcinoma from a high-incidence area for both cancers in Henan, northern China. **Dis Esophagus** 2006; 19:459-67.

Wang X, Cao W, Mo M, et al. VEGF and cortactin expression are independent predictors of tumor recurrence following curative resection of gastric cancer. **J Surg Oncol** 2010;

Weaver AM. Cortactin in tumor invasiveness. **Cancer Lett** 2008; 265:157-66.

Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, et al. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. **Curr Biol** 2001; 11:370-4.

Weed SA, Parsons JT. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. **Oncogene** 2001; 20:6418-34.

Wu MY, Zhuang CX, Yang HX, Liang YR. Expression of Egr-1, c-fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study. **World J Gastroenterol** 2004; 10:476.

Wu WK, Cho CH, Lee CW, et al. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. **Cancer Lett** 2010; 295:144-53.

Yagui-Beltran A, Jablons DM. A translational approach to lung cancer research: From EGFRs to Wnt and cancer stem cells. **Ann Thorac Cardiovasc Surg** 2009; 15:213-20.

Yamada SI, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK. Overexpression of Cortactin Increases Invasion Potential in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathol Oncol Res** 2010;

Yasar D, Karadogan I, Alanoglu G, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of adult acute leukemia patients. **Cancer Genet Cytogenet** 2010; 197:122-9.

Yen CC, Chen YJ, Chen JT, et al. Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis. **Cancer** 2001; 92:2769-77.

Yen CC, Chen YJ, Lu KH, et al. Genotypic analysis of esophageal squamous cell carcinoma by molecular cytogenetics and real-time quantitative polymerase chain reaction. **Int J Oncol** 2003; 23:871-81.

Zaharieva BM, Simon R, Diener PA, et al. High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. **J Pathol** 2003; 201:603-8.

Zardawi SJ, O'Toole SA, Sutherland RL, Musgrove EA. Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer. **Histol Histopathol** 2009; 24:385-98.

Zhang HL, Chen LQ, Liu RL, et al. The number of lymph node metastases influences survival and International Union Against Cancer tumor-node-metastasis classification for esophageal squamous cell carcinoma. **Dis Esophagus** 2010; 23:53-8.

ANEXO

Anexo 1 – Relação dos dados clínico-patológicos dos 30 casos de CEE avaliados nesse estudo.

ESOP	Localidade	HR-CGH (FFEP)	aCGH (fresco)	GN	Idade	T (cm)	Ghist	Nível Inv	Inv Vasc	Inv Linf	Margens	Meta LN	TNM	Estadio	Evolução
1	Erechim	ok	ok	M	60	4 x 2,7	G3	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0M0	2A	Vi s/ Do
2	Erechim	ok	ok	M	60	2,6	G3	Adventícia	Presente	Presente	Livres	Sim	T3N1M0	3	Vi s/ Do
3	Erechim	ok		M	46		G3								Vi c/ Ca
4	A.C.Camargo	ok	ok	M	51	3,8 x 2 x 0,7	G3	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0M0	2A	Vi s/ Do
5	A.C.Camargo	ok	ok	M	66	2,2	G3	Adventícia	NO	NO	Livres	Sim	T3N1M0	3	MoCa
6	A.C. Camargo	ok		F	66	3,3 x 2,5 x 0,2	G3	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0M0	2A	Vi s/ Do
7	A.C.Camargo	ok	ok	M	56	4,8 x 4,1 x 1,0	G2	Adventícia	Presente	Presente	Livres	Sim	T3N1M0	3	MoCa
8	A.C.Camargo	ok	ok	F	46	5 x 3,5 x 3,5	G2	Adventícia	NO	Presente	Livres	Sim	T3N0M1	4	MoCa
9	A.C.Camargo	ok	ok	M	54	3 x 2 x 1,5	G3	Adventícia	NO	NO	Livres	Sim	T3N1M1a	4A	MoCa
10	A.C.Camargo		ok	M	53	6 x 3,5	G2	Adventícia	NO	NO	Livres	Não	T4N0M0	3	MoCa
11	A.C.Camargo	ok		F	54	4	G2	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0M0	2A	Vi s/ Do
12	Erechim	ok	ok	M	51	6 x 4	G2	Adventícia	NO	NO	Livres	Não	T3N0m0	2A	Vi s/ Do
13	Erechim	ok		M	55	5 x 4,5	G3	Adventícia	Presente	NO	Livres	Sim	T4N1M1	4	MoCa
14	Erechim	ok		M	57	4	G1	Adventícia	NO	NO	Livres	Sim	T3N1M1	4A	Vi s/ Do
15	A.C.Camargo	ok	ok	F	60	4,5	G2	Muscular	NO	NO	Livres	Sim	T2N1M0	2B	MoCa
16	A.C.Camargo		ok	M	60	7	G3	Muscular	NO	Presente	Livres	Sim	T2N1M1	4	MoCa
18	A.C.Camargo		ok	F	62	2 x 1,3 x 4	G3	Lâmina	NO	NO	Livres	Não	T1N0M0	1	Vi s/ Do
19	A.C.Camargo		ok	F	66	1,5	G2	Lâmina	NO	NO	Livres	Não	T1N0M0	1	Vi s/ Do
20	A.C.Camargo		ok	F	60	2 x 1,8	G1	Muscular	NO	Presente	Livres	Sim	T2N1M0	4	Vi c/ Ca
22	AC Camargo		ok	M	74	3	G3	Adventícia	NO	NO	Livres	Não	T3N0M0	2A	Vi c/ Ca
28	AC Camargo	ok		M	67	7,5	G3	Adventícia	NO	NO	Livres	Sim	T4N1Mx	3	MoCa
29	AC Camargo	ok		M	55	5,2	G2	Adventícia	NO	NO	Livres	Não	T3N0M0	2A	MoCa
34	AC Camargo	ok		M	59	4,5	G3	Adventícia	NO	NO	Livres	Não	T3N0M0	2A	MoCa
38	Erechim	ok		M	64		G2	Adventícia	Sim	NO	Livres	Sim	T3N1M0	3	Vi
39	Erechim		ok	M	68	2,5 x 1,0	G2	Lâmina	NO	NO	Livres	Não	T1N0M0	1	Vi s/ Do
40	Erechim	ok		M	52		G2	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0M0	2A	Vi
42	Erechim	ok		M	60	4,5	G2	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0	2A	Vi
43	Erechim	ok		M	68	2,7	G2	Adventícia	Sim		Livres	Sim	T3N1Mx	3	Vi

Anexos

ESOP	Localidade	HR-CGH (FFEP)	aCGH (fresco)	GN	Idade (anos)	T (cm)	GHist	Nível Inv	Inv Vasc	Inv Linf	Margens	Meta LN	TNM	Estadio	Evolução
44	AC Camargo		ok	F	49	6.0	G2	Muscular	NO	NO	Livres	Não	T2N0M0	2	Vi s/ Do
46	AC Camargo		ok	M	52	3.0	G2*	Muscular	NO	NO	Livres	Sim	T2N1M1	4	Vi s/ Do

GN: gênero; T: tamanho do tumor; GHist: grau histológico; Inv Vasc: invasão vascular; Inv Linf: invasão linfática; Meta LN: metástase linfonodal; NO: não observado.

Anexo 2 - Regiões envolvidas em ganhos e perdas genômicas em cada um dos 21 casos de CEE avaliados, detectados por HR-CGH.

CASO	No. alterações	PERDAS GENÔMICAS	GANHOS GENÔMICOS
ESOP8	40	1p22	1p21; 1q21-q23 2p11.2-p12; 2p13; 2q11.2-q21 3p14-p21; 3p24-p26; 3q26.3-q29 4p12-p13; 4q27-q28 5p11.2 6p22-p25; 6q21-q22; 6q23-q24
		4p15.1-p15.3	8p23
		5q23; 5q34	9q21
		7p14-p15; 7p15-p21; 7q22-q31	11q12
		9p21-p23	12p11.2-p12; 12p13
		10q21; 10q24-q25	
		12q23-q24.1	
		14q24-q32	
		16p12; 16q21-q24	
		18q12; 18q23	
		19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.3	
		20p11.2-p12	
		22q11.2-q13	
			Xp11.2-p11.4; Xp22.3 Yq11.2
ESOP13	36	1p31; 1q21; 1q24-q25; 1q41-q42	1q44
		2p24	2p11.2; 2q37 3p23-p21 4q27-q28 5q12-q13 6p24-p25; 6q26-q27
		7q31-q32; 7q33-q36	8p23; 8q24.3
		9p13-p21	
		11q23-q24	
		12q23-q24.3	12q13-q14
		13q12-q13; 13q14-q22; 13q31-q32	
		15q13-q15; 15q21; 15q22-q26	
		16p12-p13.3; 16q21-q24	
		17q21-q24; 17q25	
		18q23	
		19q13.3	
		20p11.2	
		21q11.2-q22	
22q13			
Xq21-q22			
ESOP14	35	1q41	1q22-q23
		2p22-p24	2p11.2
		3p12; 3q27	
		4p15.3	4q27-q28
		6q22-q24	6p23-p25
		7q31; 7q34-q36	
		9p21	9p12; 9p23-9p24 10p11.2; 10p15

		11q22-q23; 11q23-q25 12q23 13q21-q22 14q24-q32 15q23-q26 16p12 17q22 18p11.2-p11.3 19q13.1-q13.2; 19q13.3-q13.4 20p11.2-p12; 20q11.2-q12; 20q13.1-q13.2 21q21; 21q22 22q11.2-q13	11p11.2-p12
ESOP15	52	1p31-p33; 1q24-q31; 1q32-q42 2p14-p22; 2q21; 2q31-q33; 2q35-q36 3p12-p13; 3q13.2-q24 4p15.1-p15.3; 4q12-q21; 4q22-q24; 4q32 5q21-q34 7p12-p15; 7p15-p21; 7q22; 7q31 8q23-q24 9p13-p22; 9q21; 9q22-q31 10p12 11q14-q23 12p12-p13; 12q12-q13; 12q14-q24 13q12-q33 14q22-q24 15q14-q24 16p12; 16q12.2-q13; 16q22-q24 17q12-q21; 17q21-q22 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q21; 18q22-q23 19q13.1-q13.3 20p11.2-p12 22q11.2-q13 Xq21-q24	2q37 3p25-p26 4p16 5p15.3 6p25; 6q26-q27 8p22-p23 11p15 17p13; 17q25 21q22 Xp22.2-p22.3
ESOP43	49	1p31-p36.3; 1q41-1q44 2p21-2p25; 2q36; 2q37(ter) 3p24-3p23; 3q29(ter) 4p15.3-4p16; 4q34-q35(ter) 5q23-q31; 5q32-q34 6p12; 6p22-6p25; 6q22-6q23; 6q27(ter) 7p21; 7p21-p22; 7q34-7q36 8p11.2-p12; 8p21-p23; 8q23-q24.3(ter) 9p12-9p22; 9q33-q34(ter) 10q24-q26 11q24-q25(ter) 12q25-q24.3(ter) 14q11.2-q22; 14q31-q32	1q21-1q23; 1q31-q32 2p11.2-p12; 2q11.2-1q13; 2q14.1-qq21 3p12-3p14; 3p21; 3q13.2-q13.3 4q21-q28 5p12-p13 6q12-q21 7p11.2-p13; 7q11.2-q31 8q22-q23 10p11.2-p12; 10q22-q23 11p11.2; 11q12-q13

		16p11.2; 16p12-p13.3; 16q12.1-q13; 16q21-q23 17p11.2-p12; 17p13; 17q11.2-q21; 17q24-q25(ter) 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q22-q23(ter) 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4(ter) 20p11.2-p12 21q21-q22(ter)	
ESOP9	28	1p13-p21; 1p31; 1q21; 1q25-q41; 1q42-q44 2p11.2-2p16; 2p21-p23 5q11.2-q12 6p12-p21.1; 6p22-p23; 6q24-q25 7p15-7p21; 7q32q36 9p12-p22 10q22 13q21-q32 15q13-q15 17p11.2 20p11.2-p13 Xq23	3p14-p21 4p16; 4q32-q33 5q31-q32; 5q34; 5q35(ter) 10p13-p14; 10q23-q25 16p13.2-p13.3 19p13.1 Xq27-q28(ter) Yp11.2-p11.3
ESOP7	39	2p21-p24; 2q13-q21; 2q31-q32 3p12-p14; 3q13.1-q13.3; 3q23-q26 4p12-p13; 4p15-p16; 4q12-q13 5p13-p14 8p12 9p21-p22; 9q22-q34; 9q34(ter) 13q22 14q13-q21 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12 19q13.1-q13.2 20q12-q13.2 Xp11.2-p11.3; Xq21-q22	1q42-q44 2q36-q37 3p14-p21; 3p22-p24 6p21.1-p21.2; 6p21.3; 6p23-6p25 8p12-p21 9p23-p24; 9q21-q22 10p11.2; 10q23 11q12-q13; 11q13-q14; 11q25 13q31-q34(ter) 14q24-q31; 14q32(ter) 17p13 18q12-q21 21q22(ter) 22q11.2-q12; 22q13
ESOP6	47	1p13-p33; 1q31; 1q41-q44(ter) 2p16-p23; 2q14.3-q21; 2q32-q34 3q13.3 4p13-p15.3; 4q31.2-q32 5p13-p14; 5q35(ter) 6q16-q21 7p13-p14; 7p21-p22; 7q11.2-q22; 7q22-q36 8p11.2-p12	2q11.2-q13; 2q22 3p14-p21; 3q23-q24 6p21.1-p21.3 8q23-q24.3

		9p13-p23	9q13-q21; 9q33-q34 10q25-q26 11q12-q13
		11p12-p15; 11q22-q23 12p12; 12q24-q24.3 13q21 14q22-q24 15q12-q14; 15q22-q23 16p11.2-p12; 16q22-q24 17p12; 17q11.2-q21; 17q24-q25; 17q25(ter) 18p11.2-p11.3 19p13.1 20p11.2; 20p12; 20q13.2	13q12; 13q33-q34 19q13.4(ter) 22q13
		Xp11.3-p11.4; Xq23-q24	Yp11.2-p11.1
ESOP5	57	1p22-p31; 1p32-p34.1; 1p35-p36.2 2p14-p25; 2q35-q36; 2q37 4p12-p16; 4q31.1-q31.3 5p12-p15.2; 5q21-q22; 5q31-q33; 5q34-q35(ter) 6p12-p22; 6p22-p25 7p15; 7p21; 7q22-q36 8p11.2-p22; 8p23; 8q11.2-q24.3(ter) 9p21-p23; 9q22-q31 10p13-p14; 10q11.2-q21; 10q22; 10q24-q25 11p11.2-p13; 11q22 12p12; 12q15-q24.3(ter) 13q12-q31 14q13-q23; 14q31-q32 15q14-q26 16p12-p13.2; 16q22-q24(ter) 17p13; 17q12-q23; 17q25 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q23(ter) 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.3 20p12; 20q11.2-q13.1 21q21-q22 22q11.2-q13 Xp11.2-p21; Xq22-q24 Yp11.1-q11.1	2p11.2; 2q11.2-2q12; 2q22 3p12-p13; 3p14; 3p21; 3q12-q13.3 7q21 9p12-p13; 9q21; 9q34(ter) 11p15; 11q12-q13 12p11.2; 12p13 13q34(ter)
ESOP42	48	1p31-p32; 1q41 2p22-2p24; 2q22-2q24; 2q33- q37(ter) 3p14-3p21; 3q21-3q22; 3q27- 3q29(ter) 4p15.3; 4q35(ter) 6p21.1-6p21.2; 6p22-6p25 7p14-7p15; 7p21-7p22; 7q32- q36(ter) 8q21.1; 8q22-q24.3(ter) 9p12-p22; 9q21-q22; 9q31-q34(ter)	1q22-q31; 1q32 2p12-2p16 3p25; 3q13.1-q13.3 4q13-q12; 4q13-q25; 4q27-q32 5p12-5p13; 5p15.1-5p15.2; 5q22-q23 7q21

		10q26(ter) 11p13-p14; 11p14-p15; 11q13-q14 12p11.2-p12; 12p12-p13; 12q15-q24.3 14q22-q32(ter) 15q12-q13; 15q15-q21 16p12-p13.3; 16q21 17q11.2-q12; 17q22-q25(ter) 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q22-q23(ter) 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.2; 19q13.4(ter) 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3(ter) 22q13(ter), 22p21-p22.2 Yp11.1-q11.1; Yp11.2-p11.3	10p11.2-p12; 10q21-q24 11q12 17p12-p13 22q12-q13 Xp21-p22.1
ESOP40	59	1p13; 1p31-p36.3; 1q32-q41; 1q43-q44 2p21-p24; 2q22-q24; 2q31-q32; 2q37(ter) 3p12-p14; 3p22-p26; 3q22-q23; 3q24; 3q28-q29(ter) 4p15.3-p16 5q35(ter) 6p23-p25; 6q24-q26 7p21-p22; 7q36(ter) 8p22-p23; 8q23-q24 9p12-p24 10q21; 10q25-q26(ter) 11q23-q25(ter) 12p12; 12p12-p13; 12p13; 12q24.1-q24.3(ter) 13q21-q22 14q11.2-q24 15q12-q14; 15q25 16p12-p13.2; 16q21-q22; 16q23-q24(ter) 17p12-p13 18p11.2-p11.3; 18q22-q23(ter) 19p13.1-p13.9; 19q13.1-q13.4 Yp11.1-q11.1; Yp11.3	1q21-q23 2p11.2-p12; 2p13 4p11-p13; 4p14-p15.1; 4q12-q26 5p12-p15.3; 5q11.2-q12 6p21.3-6p22; 6q12-q13; 6q14-q16; 6q22 7p12; 7q21-q22; 7q31-q35 8q13-8q21.1 9q21-q22; 9q34 10p12-10p13 11p11.2-p12; 11p14; 11q12-q14 12q12-q13 15q21-q22 17q24-q25 20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q12 Xp11.2-p22.3
ESOP4	32	1p31; 1q32-q41; 1q43-q44(ter) 2p16-p24; 2q32; 2q36-q37(ter) 3p12; 3p24; 3q29(ter) 4p15.3 5q35(ter) 6q24-q27 7q35-q36(ter) 9p21-p24; 9q21-q22; 9q22-q31; 9q33-q34 10q26(ter)	1q21-q23 3p21 5p15.3 10p11.2-p13; 10q22-q23 11p14

		12q21-q22; 12q23-q24 13q21-q22 14q11.2-q21; 14q31-q32 15q14; 15q23-q25	16q21 17p11.2
		18p11.2-p11.3; 18q22-q23 20p12 21q11.2-q21; 21q21-q22 22q13(ter) Xq21-q25; Xq26-q27; Xq28(ter)	
ESOP2	44	1q32-q41 2q32 3q25-q25.1 5q34-q35 6q24-q25 7p12-p13; 7p14-p15; 7q35-q36 8q24.3(ter) 10q25 11q22; 11q23-q25 12q23-q24.1 13q22 14q22-q24 16p13.1-p13.2 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12 22q13 Xq21-q25; Xq26-q27	1p12-p13; 1p34.1-p34.2; 1q21-q31 2p23-p25; 2p11.2; 2q22-q24 3p22-p24; 3p21 4p13; 4p16; 4q13; 4q28 6p21.3; 6p25 7q21-q22 8p23; 8q11.2-q13 9p24; 9p12 11p11.2; 11p14; 11q12-q13 12p11.2-p12; 12p13 17p12 19q13.1 Xp11.2-p22.3 Yp11.2-p11.3
ESOP12	61	1p32-p34.3 2p22-p25; 2q32-q34; 2q35-q37 3p12; 3q21-q22; 3q28-q29 4p15.1-p16; 4q31.1-q32; 4q35 5p14-p15.3; 5q11.2-q12 7p21-p22 8p21-p22; 8q24.3(ter) 9p12-p21; 9q21-q34 10p12; 10q24-q25 11p14-p15; 11q23-q24 12q21-q22; 12q23-q24.3 13q21-q22 14q13-q21 15q25-q26 16p11.2; 16p12-p13.1 17q23-q25 18q21-q23 19p13.1-p13.3	1p13; 1p21-p22; 1p31; 1q21-q23; 1q32 2p13-p15; 2q12-q13; 2q22-q24 3p22; 3q13.1-q13.3 4q12-q13; 4q24-q25 5q14-q15; 5q23; 5q31-q33 6p21.1-p21.3; 6q12-q14; 6q16-q23 7q11.2-q21; 7q22 8q11.2-q23 10q21 12p11.2-p12; 12q12-q15 13q12-q14 14q32 18p11.3

		19q13.1 20q12-q13.3 21q21-q22	20p12-p13
			Xp11.2-p21; Xp22.2-p22.3; Xq12-q24
ESOP11	59	1p36.1-p36.3; 1q41-q44 2p23-p24; 2q37(ter) 3p24-p26; 3q29(ter) 4q34-q35 5q34-q35 7q35-q36 8q22-q24.3 9q33-q34 11p15; 11q23-q24 12q23-q24.3 13q21-q31 14q31-q32 15q14-q21; 15q22-q24; 15q26 16p11.2-p13.3; 16q22-q24 17q12-q21; 17q22-q25 18p11.2-p11.3; 18q12-q23 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.3 21q21 22q11.2-q13 Xq22-q23	1p12-p22; 1p31-p32; 1q21-q32 2p11.2-p12; 2p13; 2q11.2-q31 3p12-p21; 3q13.1-q21 4p11-p16; 4q13-q13.1 5p12-p14; 5p15.2; 5q11.2-q31 6p12-p21.3; 6q12-q23 7p11.2-p14; 7q11.2-q22 8p11.2-p21; 8q11.2-q21.1 9p12-p13 10p11.1-p12; 10p14-15; 10q21-q22 11p11.2-p14; 11q12-q22 12p11.2; 12q12-q14 13q12-q14 14q11.2-q13; 14q21-q22
ESOP1	56	1p32; 1p35-p36.2; 1q41-q44 2q37(ter) 3p23-p25 4p14-p16; 4q31.3-q35 5p13-p15.1; 5p15.3; 5q32-q35 6q22; 6q24; 6q27 7p14-p22; 7q31; 7q34-q36 8p12-p22; 8q13-q21.3; 8q22-q24.3 9p12-p24; 9q13-q21; 9q22-q34 10q24-q26 11p13-p15; 11q23-q25 12q23-q24.3 13q34 14q21; 14q24; 14q31-q32 15q12-q14 16p11.2; 16p12-p13.3; 16q12.1-q24 17q11.2-q25 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4 20p12-p13; 20q13.1-q13.3 21q21-q22 22q11.2-q13 Xp22.1; Xq21-q22 Yp11.2-p11.3; Yq11.2	Xp11.2-p11.4 1q22-q23; 1q31 2p11.2; 2q11.2-q13; 2q22-q24 3q13.1-q21 4q21-q28 5q15-q21; 5q21-q23 6p21.1-p21.3; 6q12-q13 11q12-q13 12p11.2; 12q12-q15 Xp11.2; Xp11.4-p21

ESOP28	64	1p31-p33; 1p34-p36.3; 1q41-q43; 1q44	
		2q32-q33 3q13.1; 3q21-q24	2p11.2-p14; 2q12-q13; 2q22-q24 3p14-p21; 3p21-p22; 3q26.1-q27 4p12-p15.1; 4q12-q13; 4q24; 4q28- q31.3
		4q32-q33 5q31	5q14
		6p25 7p21; 7q33-q36	6p11.2-p12; 6p21.1-p21.2; 6q12-q21; 6q23-q24
			7q11.2
			8p11.2-p12; 8p21; 8q12
		9p13-p24; 9q22-q34	9q21
		10q23-q26	10p11.2-p13; 10p15
		11p14-p15; 11q23-q24	11p11.2-p12; 11p14; 11q12-q13
		12q14-q24.3	12q12-q13
		13q14; 13q22-q31	
			14q12-q22
		15q22-q24; 15q26	15q25
		16p12-p13.3	16p11.2; 16q13-q21
			17p12; 17q12-q21
		18q12-q21; 18q23(ter)	18p11.2
		19p13.1-p13.3; 19q13.3-q13.4	
			20p11.2; 20q11.2-q13.1; 20q13.2- q13.3
			21q22
		22q13	
		Xp21; Xq13-q21; Xq23; Xq26-q28	Xp11.2-p11.4
ESOP29	62	1p35-p36.3; 1q32-q41	1p13-p31; 1q21-q32
		2p16-p21; 2p23-p25; 2q33-q37	2p11.2; 2p13; 2p22; 2q11.2-q24
		3p24-p26; 3q25; 3q27-q29	3p12-p21; 3p21-p22; 3q13.1-q22
		4q32-q35	4p13-p14; 4q12-q28
		5q34-q35	5p11-p15.1; 5q11.2-q21
		6p22-p25; 6q23-q27	6p12; 6q12-q22
		7p14-p22; 7q31-q36	7q11.2-q21
			8p11.2-p21; 8q11.2-q13; 8q21.1- q21.3
		8p22; 8q23-q24.3	9p12-p13; 9q13-q31
			10p11.2-p12; 10q11.2-q24
		10p14-p15	11p11.2-p14; 11q12-q13
		11p14-p15; 11q23-q25	12p11.2-p12; 12q12-q14; 12q21
		12p12; 12q23-q24.3	13q13-q21
		13q22-q31; 13q31-q34	
		14q24-q32	
		15q26	
		16p13.1-p13.3; 16q12.1-q24	
		17q24-q25	
		18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23	
		19q13.1-q13.4	
		20p11.2-p13	
		22q13	
			Xp11.2-p21; Xp22.1; Xq12-q21

ESOP3	57	<p>1p32-p33; 1p36.2-p36.3; 1q41-q44 2p12; 2p23-p24; 2q31-q32 3p23-p25; 3q29(ter) 4p15.3; 4q31.1-q32 5p13-p14; 5p15.3; 5q32-q35 6p21.3-p25; 6q21-q22; 6q24-q26</p> <p>8p11.2-p12; 8p21; 8q24.1-q24.3 9p12-p13; 9p21-p24; 9q21; 9q32-q34 10q22-q26 11p14-p15; 11q14-q25 12p11.2-p13 13q22; 13q32-q33 14q24-q32 15q22-q26 16p11.2-p13.3; 16q21-q24 17p12-p13; 17q21-q22; 17q24-q25 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q22-q23 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.3 21q21-q22</p>	<p>1p22; 1p31; 1q22-q24; 1q31-q32 2p11.2; 2p21-p22; 2q34-q35 3p12-p21; 3q12-q13.1; 3q22-q24 4q13</p> <p>7q22</p> <p>11q12 12q21-q24.3</p>
		Yp11.2	
ESOP34	55	<p>1p12-p21; 1p32-p34.2; 1p36.1-p36.3; 1q21; 1q23-q24; 1q32; 1q43-q44 2q37 3p23-p24; 3q21-q25 4p15.1-p15.3</p> <p>6p21.1-p21.3; 6q14-q15; 6q21-q22; 6q23-q27</p> <p>8p12; 8p22-p23; 8q23-q24.2 9p12 10p12; 10p13-p15; 10q11.2-q21; 10q26(ter) 11p15; 11q12; 11q13-q14 12p13; 12q14-q24.3 13q13-q14</p> <p>15q14-q26 16p12-p13.3; 16q24 17p11.2-p12; 17p13; 17q11.2-q21 18p11.2-p11.3 19p13.1-p13.3; 19q13.4 20p11.2-p13 21q21-q22 22q11.2-q13 Xq27-q28</p>	<p>2p13; 2q22-q24 3p13-p14</p> <p>5q22-q23</p> <p>7q11.2; 7q22; 7q31-q32</p> <p>9p23-p24; 9q21-q34</p> <p>11p11.2-p14</p> <p>13q21-q31; 13q31-q33 14q21-q23</p> <p>18q21-q23</p> <p>22q13(ter) Xp11.2; Xp21; Xq21 Yq11.2</p>

ESOP38	58	1q41-q42 2p22-p24; 2q33-q36 3p12-p13 4p15.2-p16; 4q31.1-q31.2; 4q32-q34; 4q35(ter) 5q31-q35 6p23-p25 7p11.2-p13; 7p15-p22 8p22-p23 9p21-p22 10p11.2-p12; 10p13-p15; 10q22; 10q23-q26 11p15; 11q23-q25 12q14-q21; 12q24.1-q24.2 13q31-q33 14q24-q31 16p13.1-p13.3; 16q21-q24 17q21-q22; 17q24-q25 18q12 19q13.3 20p11.2-p12 21q22 22q12-q13 Xq21-q24	1p13; 1p22; 1q21-q24; 1q31-q32 2p11.2-p12; 2p16-p21; 2q11.2-q13 3p12; 3p21; 3q13.1-13.3; 3q29(ter) 4q12-q13; 4q22-q26 5q11.2; 5q22 6q12-q21; 6q22-q24 7q11.2-q22 8q12-q13; 8q24.1-q24.3 9q31-q32 11p11.2; 11q12-q13 13q13-q14 15q21-q23 20q13.3 21q22(ter) Xp11.2-p21; Xp22.1-p22.3; Xq27 Yq11.2
---------------	----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anexo 3 - Alterações genômicas em regiões mínimas comuns, detectadas por CGH array em 18 casos de CEE, e respectivos genes mapeados em tais regiões.

Região	No. Casos	Ganho	Perda	Tamanho alteração	No. genes	Genes
3q22.2-q22.3	5	ESOP19, ESOP8, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18		3305738	20	<i>PPP2R3A, MSL2, PCCB, STAG1, TMEM22, NCK1, IL20RB, SOX14, CLDN18, DZIP1L, A4GNT, DBR1, ARMC8, TXNDC6, MRAS, CEP70, FAIM, PIK3CB, FOXL2, BPESC1</i>
3q23-q24	6	ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18		9912495	37	<i>MRPS22, COPB2, RBP2, RBP1, NMNAT3, CLSTN2, SLC25A36, SPSB4, ACPL2, RASA2, RNF7, GRK7, ATP1B3, TFDP2, XRN1, ATR, PLS1, TRPC1, PCOLCE2, SR140, CHST2, SLC9A9, C3orf58, PLOD2, PLSCR4, PLSCR2, PLSCR1, PLSCR5, ZIC4, ZIC1, AGTR1, CPB1, CPA3, GYG1, HLTF, HPS3, CP</i>
3q25.1	7	ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18, ESOP16(1)		26671	1	<i>CP</i>
3q25.1-q25.2	6	ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18		4904546	28	<i>TM4SF18, TM4SF1, TM4SF4, WWTR1, COMMD2, RNF13, PFN2, TSC22D2, SERP1, EIF2A, SELT, C3orf44, SIAH2, CLRN1, CLRN1OS, GPR171, P2RY14, GPR87, P2RY13, MED12L, P2RY12, IGSF10, AADAC, SUCNR1, MBNL1, P2RY1, RAP2B, SGEF</i>
3q25.2-q26.31	7	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18		18667713	63	<i>SGEF, DHX36, MME, PLCH1, C3orf33, SLC33A1, GMPS, KCNAB1, SSR3, TIPARP, CCNL1, PTX3, VEPH1, SHOX2, RSRC1, MLF1, GFM1, LXN, RARRES1, MFSD1, SCHIP1, IL12A, SMC4, TRIM59, KPNA4, ARL14, PPM1L, B3GALNT1, NMD3, C3orf57, OTOL1, SI, SLITRK3, BCHE, ZBBX, SERPINI2, WDR49, PDCD10, SERPINI1, GOLIM4, EVI1, MDS1, ARPM1, MYNN, LRRC34, LRRC31, SAMD7, SEC62, GPR160, PHC3, PRKCI, SKIL, CLDN11, SLC7A14, EIF5A2, SLC2A2, TNIK, PLD1, FNDC3B, GHSR, TNFSF10, AADA1, ECT2</i>

3q26.31	7	ESOP44, ESOP9, ESOP12, ESOP19, ESOP18, ESOP8, ESOP22(1)	401	1	<i>ECT2</i>
3q26.31-q29	7	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18	25267123	125	<i>SPATA16, NLGN1, NAALADL2, TBL1XR1, KCNMB2, ZMAT3, PIK3CA, KCNMB3, ZNF639, MFN1, GNB4, ACTL6A, MRPL47, NDUFB5, USP13, PEX5L, TTC14, CCDC39, FXR1, DNAJC19, SOX2OT, ATP11B, DCUN1D1, MCCC1, LAMP3, MCF2L2, B3GNT5, KLHL6, KLHL24, YEATS2, MAP6D1, PARL, ABCC5, HTR3C, EIF2B5, DVL3, AP2M1, ABCF3, ALG3, CAMK2N2, ECE2, PSMD2, EIF4G1, FAM131A, CLCN2, POLR2H, THPO, CHRD, EPHB3, MAGEF1, VPS8, EHHADH, MAP3K13, TMEM41A, LIPH, SENP2, IGF2BP2, TRA2B, ETV5, DGKG, CRYGS, TBCCD1, DNAJB11, AHSB, FETUB, HRG, KNG1, EIF4A2, RFC4, ADIPOQ, ST6GAL1, RPL39L, RTP1, MASP1, RTP4, SST, BCL6, LPP, TPRG1, TP63, LEPREL1, CLDN1, CLDN16, IL1RAP, OSTN, UTS2D, CCDC50, FGF12, C3orf59, HRASLS, MGC2889, ATP13A4, OPA1, HES1, LRRC15, GP5, ATP13A3, TMEM44, LSG1, FAM43A, C3orf21, ACAP2, PPP1R2, OSTalpha, PCYT1A, TCTEX1D2, TM4SF19, UBXLN7, RNF168, WDR53, FBXO45, C3orf34, PIGX, PAK2, SENP5, NCBP2, LOC152217, PIGZ, MFI2, DLG1, FYTDD1, LRCH3, IQCG, RPL35A, LMLN</i>
5q23.1	3	ESOP44, ESOP12, ESOP8	1371482	5	<i>DMXL1, TNFAIP8, HSD17B4, FAM170A, PRR16</i>
5q31.3	3	ESOP44, ESOP12, ESOP8	401	0	
5q35.2	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	7378	1	<i>FGFR4</i>
8q23.3	3	ESOP7, ESOP12, ESOP20	1042307	0	

8q23.3-q24.22	5	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP20, ESOP16(1)	18964554	61	<i>TRPS1, EIF3H, UTP23, RAD21, SLC30A8, MED30, EXT1, SAMD12, TNFRSF11B, COLEC10, MAL2, NOV, ENPP2, TAF2, DSCC1, DEPDC6, MRPL13, MTBP, SNTB1, HAS2, ZHX2, DERL1, WDR67, FAM83A, C8orf76, ZHX1, ATAD2, WDYHV1, FBXO32, KLHL38, ANXA13, FAM91A1, FER1L6, TMEM65, TRMT12, RNF139, TATDN1, NDUFB9, MTSS1, ZNF572, SQLE, KIAA0196, NSMCE2, TRIB1, FAM84B, LOC727677, MYC, PVT1, GSDMC, FAM49B, ASAP1, DDEF1IT1, ADCY8, EFR3A, HHLA1, KCNQ3, LRRC6, TMEM71, PHF20L1TG, SLA, WISP1</i>
8q24.22	6	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP20, ESOP18, ESOP16(1)	57976	1	<i>NDRG1</i>
8q24.22-q24.3	5	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP20, ESOP16(1)	9487692	24	<i>ST3GAL1, ZFAT, LOC286094, KHDRBS3, FAM135B, KCNK9, TRAPPC9, CHRAC1, EIF2C2, PTK2, DENND3, GPR20, PTP4A3, FLJ43860, TSNARE1, BAI1, ARC, JRK, PSCA, LY6K, C8orf55, SLURP1, LYNX1, LY6D</i>
9p24.3	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	768838	1	<i>DMRT1</i>
9p24.3-p21.3	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	20347979	56	<i>DMRT3, DMRT2, SMARCA2, FLJ35024, VLDLR, KCNV2, KIAA0020, RFX3, GLIS3, C9orf70, SLC1A1, C9orf68, CDC37L, AK3, RCL1, JAK2, INSL6, INSL4, RLN2, C9orf46, CD274, PDCD1LG2, KIAA1432, MLANA, KIAA2026, IL33, TPD52L3, UHRF2, GLDC, KDM4C, PTPRD, TYRP1, MPDZ, NFIB, ZDHHC21, CER1, FREM1, TTC39B, SNAPC3, PSIP1, C9orf93, BNC2, CNTLN, SH3GL2, ADAMTSL1, FAM154A, RRAGA, HAUS6, ADFP, DENND4C, RPS6, SLC24A2, MLLT3, KIAA1797, IFNB1, IFNW1</i>
9p21.3	4	ESOP9, ESOP12, ESOP19, ESOP8	16497	1	<i>KLHL9</i>
9p21.3	5	ESOP9, ESOP12, ESOP2, ESOP19, ESOP8	661312	9	<i>IFNA2, IFNA8, LOC554202, IFNE, MTAP, C9orf53, CDKN2A, CDKN2BAS, CDKN2B</i>
9p21.3-p21.1	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	10697998	16	<i>ELAVL2, C9orf82, PLAA, IFT74, LRRC19, TEK, NCRNA00032, MOBKL2B, IFNK, C9orf72, LINGO2, ACO1, DDX58, TOPORS, NDUFB6, TAF1L</i>

9p13.3-p13.1	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	2757203	14	<i>RNF38, MELK, PAX5, ZCCHC7, GRHPR, ZBTB5, POLR1E, FRMPD1, RG9MTD3, EXOSC3, WDR32, MCART1, SHB, ALDH1B1</i>
11q13.2	5	ESOP22(1), ESOP15, ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	209961	2	<i>CHKA, SUV420H1</i>
11q13.2	6	ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	154219	2	<i>C11orf24, LRP5</i>
11q13.2	7	ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	196972	2	<i>LRP5, SAPS3</i>
11q13.2	8	ESOP12, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	268724	4	<i>SAPS3, GAL, MTL5, CPT1A</i>
11q13.2	7	ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	20445	0	
11q13.2	8	ESOP12, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	392339	4	<i>MRPL21, IGHMBP2, MRGPRF, TPCN2</i>
11q13.2	9	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	312056	1	<i>MYEOV</i>

11q13.2-q13.3	10	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1), ESOP2	808647	9	<i>CCND1, ORAOV1, FGF19, FGF4, FGF3, ANO1, FADD, PPFIA1, CTTN</i>
11q13.3	9	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP10, ESOP7, ESOP2, ESOP16(1)	170508	2	<i>CTTN, SHANK2</i>
11q13.3	8	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP7, ESOP16(1), ESOP2	72316	1	<i>SHANK2</i>
11q13.3	6	ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP7, ESOP2, ESOP16(1)	204149	1	<i>SHANK2</i>
11q13.4	5	ESOP22(1), ESOP20, ESOP39(2), ESOP16(1), ESOP2	108173	2	<i>DHCR7, NADSYN1</i>
14q32.12	8	ESOP7, ESOP15, ESOP9, ESOP4, ESOP12, ESOP20, ESOP1, ESOP22(1)	401	1	<i>CATSPERB</i>
18q12.1	3	ESOP9, ESOP16(1), ESOP12	3169468	2	<i>CDH2, DSC3</i>

					DSC2, DSG1, DSG4, DSG3, DSG2, TTR, B4GALT6, KIAA1012, RNF125, RNF138, MEP1B, FAM59A, KLHL14, C18orf34, ASXL3, NOL4, DTNA, MAPRE2, ZNF397, ZNF397OS, ZNF271, ZNF24, ZNF396, INO80C, GALNT1, C18orf21, RPRD1A, SLC39A6, ELP2, MOCOS, FHOD3, KIAA1328, BRUNOL4, LOC647946, KC6, PIK3C3, RIT2, SYT4, SETBP1, SLC14A2, SLC14A1, SIGLEC15, KIAA1632, PSTPIP2, ATP5A1, HAUS1, C18orf25, RNF165, LOXHD1, ST8SIA5, PIAS2, KATNAL2, HDHD2, IER3IP1, SMAD2, KIAA0427, SMAD7, DYM, RPL17, LIPG, ACAA2, MYO5B, CCDC11, MBD1, CXXC1, C18orf24, MAPK4, MRO, ME2, ELAC1, SMAD4, MEX3C, DCC, MBD2, POLI, STARD6, C18orf54, C18orf26, RAB27B, CCDC68, TCF4, TXNL1, WDR7, ST8SIA3, ONECUT2, FECH, NARS, ATP8B1, NEDD4L, ALPK2, MALT1, ZNF532, LOC390858, SEC11C, GRP, RAX, CPLX4, LMAN1, CCBE1, PMAIP1, MC4R, CDH20, RNF152, PIGN, KIAA1468, TNFRSF11A, ZCCHC2, PHLPP, BCL2, KDSR, VPS4B, SERPINB5, SERPINB12, SERPINB13, SERPINB4, SERPINB3, SERPINB11, SERPINB7, SERPINB2, SERPINB10, SERPINB8, C18orf20, CDH7, CDH19, DSEL, TMX, CCDC102B, DOK6, CD226, RTTN, SOCS6, CBLN2, NETO1, FBXO15, C18orf55, CYB5A, CNDP2, CNDP1, ZNF407, ZADH2, TSHZ1, C18orf62, ZNF516, ZNF236, MBP, GALR1
18q12.1-q23	4	ESOP16(1), ESOP9, ESOP12, ESOP8	47196693	146	
18q23	3	ESOP16(1), ESOP12, ESOP8	1776658	8	SALL3, ATP9B, NFATC1, CTDP1, KCNG2, PQLC1, TXNL4A, C18orf22
19q13.11	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8	247426	1	LSM14A

21q22.2- q22.3	3	ESOP12, ESOP8, ESOP18	7535846	83	<i>PSMG1, BRWD1, HMG1, WRB, LCA5L, SH3BGR, C21orf88, B3GALT5, IGSF5, PCP4, DSCAM, BACE2, PLAC4, FAM3B, MX2, MX1, TMPRSS2, C21orf129, RIPK4, PRDM15, C2CD2, ZNF295, C21orf121, UMODL1, C21orf128, ABCG1, TFF3, TFF2, TFF1, TMPRSS3, UBASH3A, RSPH1, SLC37A1, PDE9A, WDR4, NDUFV3, PKNOX1, CBS, U2AF1, CRYAA, C21orf125, C21orf84, HSF2BP, RRP1B, PDXK, CSTB, RRP1, LOC284837, AGPAT3, TRAPPC10, PWP2, C21orf33, ICOSLG, DNMT3L, AIRE, PFKL, C21orf2, TRPM2, LRRC3, C21orf29, UBE2G2, SUMO3, PTTG1IP, ITGB2, C21orf67, C21orf70, C21orf122, ADARB1, POFUT2, LOC642852, COL18A1, SLC19A1, PCBP3, COL6A1, COL6A2, FTCD, C21orf56, LSS, MCM3AP, C21orf57, C21orf58, PCNT, DIP2A</i>
---------------------------	---	--------------------------	---------	----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anexo 4 - Alterações genômicas detectadas por HR-CGH em 18 casos de CEE, que são consistentes com dados da literatura.

GANHO	Total	Freq	Autor	Região	Achados específicos
1p12-p13	5	23,8%	7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	7. 1p 9. 1p11-q22 11. 1p11-q22	
1p21-p22	6	28,6%	7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	7. 1p 9. 1p11-q22 11. 1p11-q22	
1q22-q23	14	66,7%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 1p11-q22 11. 1p11-q22	11. Metástase linfonodal
1q31	9	42,9%	8. Kwong et al. 2004 11. Qin et al. 2008	8. 1q31-qter 11. 1q	11. Metástase linfonodal
2p11.2	11	52,4%	5. Noguchi et al. 2003	5. 2p	5. Invasão linfática
2p12	9	42,9%	5. Noguchi et al. 2003	5. 2p	5. Invasão linfática
2p13	6	28,6%	5. Noguchi et al. 2003	5. 2p	5. Invasão linfática
2q11.2	11	52,4%			
2q12-q13	8	38,1%			
2q22	10	47,6%			
2q24	6	28,6%			
3p12	8	38,1%			
3p14	11	52,4%			
3p21	12	57,1%			
3q12-q13.1	7	33,3%	5. Noguchi et al. 2003 11. Qin et al. 2008	5. 3q 11. 3q	5. pT, estadio clínico 11. Metástase linfonodal
3q13.1-q13.3	9	42,9%	5. Noguchi et al. 2003 11. Qin et al. 2008	5. 3q 11. 3q	5. pT, estadio clínico 11. Metástase linfonodal
4p12-p13	6	28,6%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 4p13-q31 11. 4p13-q31	
4q12-q13	7	33,3%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 4p13-q31 11. 4p13-q31	

4q24	9	42,9%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 4p13-q31 11. 4p13-q31	
4q25-q26	7	33,3%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 4p13-q31 11. 4p13-q31	
4q26-q27	7	33,3%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 4p13-q31 11. 4p13-q31	
4q28	9	42,9%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 4p13-q31 11. 4p13-q31	
5q23	8	38,1%			
6p21.3	8	38,1%	11. Qin et al. 2008	11. 6p	11. Metástase linfonodal
6q12	9	42,9%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 6p12-q14 11. 6p12-q14	
6q13-q14	8	38,1%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 6p12-q14 11. 6p12-q14	
6q16	7	33,3%	11. Qin et al. 2008	11. 6q	
6q21	8	38,1%	11. Qin et al. 2008	11. 6q	
7q11.2	9	42,9%	2. Yen et al. 2001 11. Qin et al. 2008	2. 7q 11. 7q	2. Pior prognóstico
7q21	9	42,9%	2. Yen et al. 2001 8. Kwong et al. 2004 11. Qin et al. 2008	2. 7q 8. 7q21-q31 11. 7q	2. Pior prognóstico
7q22	8	38,1%	2. Yen et al. 2001 3. Ueno et al. 2002 6. Yen et al. 2003 8. Kwong et al. 2004 11. Qin et al. 2008	2. 7q 3. 7q22 6. 7q22 8. 7q21-q31 11. 7q	2. Pior prognóstico 3. Estadio I
8q11.2	6	28,6%	5. Noguchi et al. 2003 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	5. 8q 7. 8q 9. 8q 11. 8q	5. Infiltração tumoral 11. Metástase linfonodal
8q13	7	33,3%	5. Noguchi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	5. 8q 9. 8q 11. 8q	11. Metástase Linfonodal

9p12	5	23,8%	9. Wang et al. 2006	9. 9p	
9q21	8	38,1%			
10p11.2	8	38,1%			
10p11.2-p12	7	33,3%			
10q23	9	42,9%			
11p11.2-p12	9	42,9%			
11p15	7	33,3%			
			1. Tada et al. 2000	1. 11p12	
			2. Yen et al. 2001	2. 11q12.3-q13	
			5. Noguchi et al. 2003	5. 11q	
			8. Kwong et al. 2004	8. 11q11-q13	
			9. Wang et al. 2006	9. 11q12-q23	
			10. Sugimoto et al. 2007	10. 11q12	1. Cultura celular
11q12	15	71,4%	11. Qin et al. 2008	11. 11q12-q23	10. Análise integrada
			1. Tada et al. 2000		
			2. Yen et al. 2001	2. 11q12.3-q13	
			3. Ueno et al. 2002	3. 11q13	
			5. Noguchi et al. 2003	5. 11q	
			6. Yen et al. 2003	6. 11q13	
			7. Shiomi et al. 2003	7. 11q13.3-q13.5	
			8. Kwong et al. 2004	8. 11q11-q13	
			9. Wang et al. 2006	9. 11q12-q23	1. Cultura celular
			10. Sugimoto et al. 2007	10. 11q13	3. Estadio I
11q13	13	61,9%	11. Qin et al. 2008	11. 11q12-q23	10. Análise integrada
12p11.2	8	38,1%	11. Qin et al. 2008	11. 12p	11. Metástase linfonodal
12q12-q13	6	28,6%			
PERDA	Total	Freq	Autor	Região	Achados específicos
1p31	10	47,6%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 1p 11. 1p	11. Metástase linfonodal
1p33	11	52,4%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 1p 11. 1p	11. Metástase linfonodal

1p36.1-p36.3	11	52,4%	2. Yen et al. 2001 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 1p34.1-pter 9. 1p 11. 1p	11. Metástase linfonodal
1q41	17	81,0%			
1q42	13	61,9%			
1q43	12	57,1%			
1q44	12	57,1%			
2p16-p21	7	33,3%			
2p23-p24	14	66,7%			
2q31	6	28,6%			
2q32	5	23,8%			
2q36-q37	10	47,6%			
3p12-p13	6	28,6%	3. Ueno et al. 2002 6. Yen et al. 2003 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	3. 3p11-p21 6. 3p 7. 3p 9. 3p 11. 3p	3. Estadio I 11. Metástase linfonodal
3p24	9	42,9%	1. Tada et al. 2000 2. Yen et al. 2001 6. Yen et al. 2003 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	1. 3p21-pter 2. 3p21.32-pter 6. 3p 7. 3p 9. 3p 11. 3p	1. Cultura celular 11. Metástase linfonodal
3p25	6	28,6%	1. Tada et al. 2000 2. Yen et al. 2001 6. Yen et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al.	1. 3p21-pter 2. 3p21.32-pter 6. 3p 9. 3p 11. 3p	1. Cultura celular 11. Metástase linfonodal
3q21-q23	7	33,3%			
3q29	10	47,6%			

4p15.1	7	33,3%	2. Yen et al. 2001 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 4p14-p15.3 9. 4p 11. 4p	2. Estádio IV, pior prognóstico 11. Metástase linfonodal
4p15.2-p15.3	16	76,2%	2. Yen et al. 2001 8. Kwong et al. 2004 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 4p14-p15.3 8. 4p15.2-p12 9. 4p 11. 4p	2. Estádio IV, pior prognóstico 11. Metástase linfonodal
4q31.2	6	28,6%	11. Qin et al. 2008	11. 4q	11. Metástase linfonodal
4q32-q33	6	28,6%	1. Tada et al. 2000 3. Ueno et al. 2002 11. Qin et al. 2008	1. 4q28-q33 3. 4q32-q34 11. 4q	1. Cultura celular 3. Estadio I 11. Metástase linfonodal
5p13-p14	6	28,6%			
5q32	6	28,6%	2. Yen et al. 2001 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 5q32-qter 7. 5q 9. 5q 11. 5q	
5q33	7	33,3%	2. Yen et al. 2001 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 5q32-qter 7. 5q 9. 5q 11. 5q	
5q34-q35	14	66,7%	2. Yen et al. 2001 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 5q32-qter 7. 5q 9. 5q 11. 5q	
6p22	6	28,6%			
6p23	9	42,9%			
6p25	8	38,1%			
6q22	6	28,6%	6. Yen et al. 2003	6. 6q15-qter	
6q24	9	42,9%	6. Yen et al. 2003	6. 6q15-qter	
6q25	8	38,1%	6. Yen et al. 2003	6. 6q15-qter	
6q26	7	33,3%	6. Yen et al. 2003	6. 6q15-qter	

6q27	7	33,3%	6. Yen et al. 2003	6. 6q15-qter	
7p15	14	66,7%			
7p21	14	66,7%			
7p22	10	47,6%			
7q31	9	42,9%			
7q32-q33	7	33,3%	6. Yen et al. 2003	6. 7q32-qter	
7q34-q36	14	66,7%	6. Yen et al. 2003	6. 7q32-qter	
8p12	6	28,6%	1. Tada et al. 2000 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	1. 8p 9. 8p 11. 8p	1. Cultura celular
8p22	10	47,6%	1. Tada et al. 2000 2. Yen et al. 2001 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	1. 8p 2. 8p22-pter 9. 8p 11. 8p	1. Cultura celular 2. Estadio avançado
8q23	13	61,9%			
8q23-q24.1	12	57,1%			
8q24.2	10	47,6%			
8q24.3	9	42,9%			
9p12	9	42,9%	6. Yen et al. 2003	6. 9p	
9p13	14	66,7%	6. Yen et al. 2003 8. Kwong et al. 2004	6. 9p 8. 9pter-p13	
9p21-p23	17	81,0%	1. Tada et al. 2000 2. Yen et al. 2001 3. Ueno et al. 2002 3a. Ueno et al. 2002 6. Yen et al. 2003	1. 9p21 2. 9p21 3. 9p21 3a. 9p21-p23 6. 9p	1. Cultura celular 2. Estadio avançado, pior prognóstico 3. Estadio I 3a. Estadio III e IV
9q21	8	38,1%	2. Yen et al. 2001 9. Wang et al. 2006 10. Sugimoto et al. 2007 11. Qin et al. 2008	2. 9q21 9. 9q 10. 9q21 11. 9q	2. Estadio avançado
9q22	9	42,9%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 9q 11. 9q	

9q31	10	47,6%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 9q 11. 9q	
9q32-q34	9	42,9%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 9q 11. 9q	
10p12	6	28,6%	11. Qin et al. 2008	11. 10p	11. Metástase linfonodal
10p13	7	33,3%	11. Qin et al. 2008	11. 10p	11. Metástase linfonodal
10p14	6	28,6%	11. Qin et al. 2008	11. 10p	11. Metástase linfonodal
10q24-q25	11	52,4%	11. Qin et al. 2008	11. 10q	11. Metástase linfonodal
10q25-q26	10	47,6%	11. Qin et al. 2008	11. 10q	11. Metástase linfonodal
11p13	6	28,6%			
11p14	8	38,1%	1. Tada et al. 2000	1. 11p14-pter	
11p15	12	57,1%	1. Tada et al. 2000	1. 11p14-pter	1. Cultura celular
11q22	6	28,6%	3. Ueno et al. 2002 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	3. 11q22-q23 9. 11q 11. 11q	3. Estadio II e IV, metástase linfonodal
11q23-1q25	13	61,9%	2. Yen et al. 2001 3. Ueno et al. 2002 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 11q23-qter 3. 11q22-q23 9. 11q 11. 11q	2. Pior prognóstico 3. Estadio II e IV
12p12	8	38,1%			
12p13	7	33,3%			
12q15-q21	8	38,1%			
12q22	11	52,4%			
12q23-q24	17	81,0%			
12q24.1-q24.2	17	81,0%			
12q24.3	16	76,2%			
13q21	12	57,1%	7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	7. 13q 9. 13q 11. 13q	11. Metástase linfonodal
13q22	13	61,9%	7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	7. 13q 9. 13q 11. 13q	11. Metástase linfonodal

13q31	9	42,9%	7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	7. 13q 9. 13q 11. 13q	11. Metástase linfonodal
13q32	7	33,3%	7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	7. 13q 9. 13q 11. 13q	11. Metástase linfonodal
14q13-q21	9	42,9%			
14q22	7	33,3%			
14q24	11	52,4%			
14q31-q32	11	52,4%			
15q12	7	33,3%			
15q14	11	52,4%			
15q21	8	38,1%			
15q22-q24	10	47,6%			
15q25-q26	11	52,4%			
16p11.2	9	42,9%	5. Noguchi et al. 2003	5. 16p	5. Invasão linfática
16p12	14	66,7%	5. Noguchi et al. 2003	5. 16p	5. Invasão linfática
16p13.1-p13.2	14	66,7%	2. Yen et al. 2001 5. Noguchi et al. 2003	2. 16p13.1-pter 5. 16p	5. Invasão linfática
16p13.3	11	52,4%	2. Yen et al. 2001 5. Noguchi et al. 2003	2. 16p13.1-pter 5. 16p	5. Invasão linfática
16q21-q22	14	66,7%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 16q 11. 16q	
16q23	12	57,1%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 16q 11. 16q	
17p12	8	38,1%	2. Yen et al. 2001 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 17cen-p12 9. 17p 11. 17p	11. Metástase linfonodal
17q12	9	42,9%			
17q21	9	42,9%			
17q22	12	57,1%			

17q24-q25	12	57,1%			
18p11.2-p11.3	15	71,4%			
18q11.2	11	52,4%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 18q 11. 18q	11. Metástase linfonodal
18q12	14	66,7%	9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	9. 18q 11. 18q	11. Metástase linfonodal
18q21-q22	9	42,9%	1. Tada et al. 2000 2. Yen et al. 2001 3. Ueno et al. 2002 4. Ueno et al. 2003 6. Yen et al. 2003 7. Shiomi et al. 2003 9. Wang et al. 2006 10. Sugimoto et al. 2007 11. Qin et al. 2008	1. 18q21-qter 2. 18q22-qter 3. 18q22-qter 4. 18q22-qter 6. 18q21-qter 7. 18q21.2-q22 9. 18q 10. 18q22 11. 18q	1. Cultura celular 3. Estadio I 11. Metástase linfonodal
18q23	15	71,4%	1. Tada et al. 2000 2. Yen et al. 2001 3. Ueno et al. 2002 6. Yen et al. 2003 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	1. 18q21-qter 2. 18q22-qter 3. 18q22-qter 6. 18q21-qter 9. 18q 11. 18q	1. Cultura celular 3. Estadio I 11. Metástase linfonodal
19p13.1	14	66,7%	2. Yen et al. 2001 8. Kwong et al. 2004 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 19p 8. 19p13.2-q12 9. 19p 11. 19p	11. Metástase linfonodal
19p13.2-p13.3	13	61,9%	2. Yen et al. 2001 8. Kwong et al. 2004 9. Wang et al. 2006 11. Qin et al. 2008	2. 19p 8. 19p13.2-q12 9. 19p 11. 19p	11. Metástase linfonodal
19q13.1	12	57,1%	2. Yen et al. 2001	2. 19q	
19q13.2	14	66,7%	2. Yen et al. 2001	2. 19q	
19q13.3-q13.4	12	57,1%	2. Yen et al. 2001	2. 19q	

20p11.2-p12	17	81,0%			
20q11.2-q12	9	42,9%			
20q13.1-q13.2	9	42,9%			
21q11.2-q21	8	38,1%			
21q22	11	52,4%			
22q11.2	10	47,6%			
22q12	10	47,6%			
22q13	16	76,2%			

Anexo 5 - Alterações genômicas detectadas por aCGH em 18 casos de CEE, que são consistentes com dados da literatura.

Region	No. Casos	Ganho	Perda	Autor (região citada)	Genes concordantes
3q22.2-q22.3	5	ESOP19, ESOP8, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18			
3q23-q24	6	ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18			
3q25.1	7	ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18, ESOP16(1)			
3q25.1-q25.2	6	ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18			
3q25.2-q26.31	7	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18		- Kim et al. 2006 (del 3q26.2) - Hirasaki et al. 2007 (3q26.2) - Hirasaki et al. 2007 (3q25.31) - Hirasaki et al. 2007 (3q26.31)	- EIF5A - MDS1, SKIL, CLDN11 - KCNAB1 - TNFSF10
3q26.31	7		ESOP44, ESOP9, ESOP12, ESOP19, ESOP18, ESOP8, ESOP22(1)		

				- Ishizuka et al. 2002 (3q26) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.2) - Hirasaki et al. 2007 (3q29) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.1) - Hirasaki et al. 2007(3q26.32) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.1) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.3-q28) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.1) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.3) - Hirasaki et al. 2007 (3q27.3) - Carneiro et al 2008 (3q27.1-q29)	- PIK3CA - ETV5 - MF12, DLG1, LRCH3, IQCG - MCF2L2, B3GNT5 - PIK3CA, KCNMB3 - AP2M1, ABCF3, ALG3, ECE2, EPHB3 - LPP - THPO, CHR1 - MASP1 - MAP3K13
3q26.31-q29	7	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP12, ESOP22(1), ESOP20, ESOP18	-		
5q23.1	3		ESOP44, ESOP12, ESOP8	- Hirasaki et al. 2007 (5q23.1)	
5q31.3	3		ESOP44, ESOP12, ESOP8		
5q35.2	3		ESOP9, ESOP12, ESOP8		
8q23.3	3		ESOP7, ESOP12, ESOP20		
8q23.3-q24.22	5	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP20, ESOP16(1)		- Arai et al. 2003 - Hirasaki et al 2007 (8q24.21) - Carneiro et al. 2008 (8q24.13-q24.23)	- MYC; - MYC, PVT1 - MYC, WISP1, NOV, TAF2, MTSS1
8q24.22	6	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP20, ESOP18, ESOP16(1)			
8q24.22-q24.3	5	ESOP9, ESOP19, ESOP8, ESOP20, ESOP16(1)		- Kim et al. 2006 (del 8q24-ter) - Carneiro et al 2008 (8q24.3)	- PTK2 - PTK2
9p24.3	3		ESOP9, ESOP12, ESOP8	- Carneiro et al 2008 (9p24.3-p24.2; 9p24.19-p22.3)	
9p24.3-p21.3	3		ESOP9, ESOP12, ESOP8	- Carneiro et al 2008 (9p24.3-p24.2; 9p24.19-p22.3; 9p22.3-p21.2; 9p23; 9p21.3)	

9p21.3	4	ESOP9, ESOP12, ESOP19, ESOP8		
9p21.3	5	ESOP9, ESOP12, ESOP2, ESOP19, ESOP8	- Kim et al. 2006 (9p21) - Hirasaki et al. 2007 (9p21.3) - Carneiro et al 2008 (9p22.3- P21.2)	- MTAP, CDKN2A - MTAP - MTAP, CDKN2A, CDKN2B
9p21.3- p21.1	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
9p13.3- p13.1	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
11q13.2	5	ESOP22(1), ESOP15, ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)		
11q13.2	6	ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)		
11q13.2	7	ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)		
11q13.2	8	ESOP12, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	- Hirasaki et al 2007 (11q13.3) - Sugimoto et al. 2009 (11q13.1- q13.3)	- CPT1A - GAL
11q13.2	7	ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)		
11q13.2	8	ESOP12, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)		

11q13.2	9	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1)	- Carneiro et al 2008 (11q13.3)	- MYEOV
11q13.2- q13.3	10	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP39(2), ESOP10, ESOP7, ESOP16(1), ESOP2	- Ishizuka et al. 2002 (11q13) - Arai et al. 2003 (11q13) - Kim et al. 2006 (11q13) - Hirasaki et al 2007 (11q13.3- q13.4) - Hirasaki et al 2007 (11q13.3) - Carneiro et al 2008 (11q13.3)	- CCND1, FGF4 - CCND1, FGF3, FGF4 - CCND1 - PPFIA1, CTTN - CCND1, ORAOV1, FGF4, FGF3 - CCND1, FGF4, FGF3
11q13.3	9	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP10, ESOP7, ESOP2, ESOP16(1)	- Hirasaki et al 2007 (11q13.3- q13.4)	- CTTN, SHANK2
11q13.3	8	ESOP12, ESOP46, ESOP22(1), ESOP15, ESOP20, ESOP7, ESOP16(1), ESOP2	- Hirasaki et al 2007 (11q13.3- q13.4)	- SHANK2
11q13.3	6	ESOP22(1), ESOP20, ESOP15, ESOP7, ESOP2, ESOP16(1)	- Hirasaki et al 2007 (11q13.3- q13.4)	- SHANK2
11q13.4	5	ESOP22(1), ESOP20, ESOP39(2), ESOP16(1), ESOP2		
14q32.12	8	ESOP7, ESOP15, ESOP9, ESOP4, ESOP12, ESOP20, ESOP1, ESOP22(1)		

18q12.1	3	ESOP9, ESOP16(1), ESOP12	- Sugimoto et al. 2008 (18q12.1- q23)	
18q12.1- q23	4	ESOP16(1), ESOP9, ESOP12, ESOP8	- Kim et al. 2006 (18q21.3) - Hirasaki et al. 2007 (18q22.3) - Hirasaki et al. 2007(18q23) - Sugimoto et al. 2009 (18q12.1- q23)	- DCC - NETO1 - LOC400662 - GALR1
18q23	3	ESOP16(1), ESOP12, ESOP8	6) Sugimoto et al. 2008 (18q12.1- q23)	
19q13.11	3	ESOP9, ESOP12, ESOP8		
21q22.2- q22.3	3	ESOP12, ESOP8, ESOP18		
