MicroRNAS EM PACIENTES COM HISTÓRIA FAMILIAR DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

THIAGO CELESTINO CHULAM

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Co-Orientador: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Chulam, Thiago Celestino

MicroRNAs em pacientes com história familiar de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Thiago Celestino Chulam – São Paulo, 2013. 102p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Luiz Paulo Kowalski

Descritores: 1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 2. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO. 3. HEREDITARIEDADE. 4. HISTÓRIA FAMILIAR. 5. MicroRNAs.

" O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho."

Abraham Lincoln

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Victor Chulam e Andrea Julia Celestino Chulam, pelo sacrificio, dedicação, pela educação e pelos princípios. O que represento hoje é fruto do trabalho de vocês.

Às minhas amadas irmãs, Tatiana Chulam e Ana Carolina Chulam, pelo apoio, pelo carinho, pelo orgulho e por sempre acreditarem em meu potencial.

À minha esposa, Carolina Salim G. Freitas Chulam, pelo incentivo, pela cumplicidade, dedicação, amor e companheirismo.

A Deus, por toda força, amparo e luz

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luiz Paulo Kowalski, Diretor do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital AC Camargo, meu orientador, por me incentivar e servir como exemplo de pesquisador e cirurgião. A ele devo todo meu respeito, admiração e gratidão.

À Professora Doutora Silvia Regina Rogatto, pesquisadora do Hospital AC Camargo e co-orientadora de minha tese. Rígida, exigente, me ensinou que a ciência deve sempre ser respeitada e valorizada em sua essência.

Aos membros do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo. Em especial: Dr. Mauro Kasuo Ikeda, Dr. José Guilherme Vartanian, Dr. Genival Barbosa de Carvalho, Dr. André Ywata de Carvalho, Dr. José Magrim, Dr. Renan Lira e Dr. João Gonçaves Filho por todos os ensinamentos transmitidos, pelo companheirismo e por ensinarem o que representa uma verdadeira equipe.

Aos demais funcionários do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A C Camargo entre eles Silvânia, Rita, Benedita e Patrícia. Obrigado pela paciência e dedicação para com os pacientes de nosso departamento.

À Enfermeira Julia Mariko Fuwa Toyota, responsável pela coleta de dados de vários projetos dirigidos pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. Sem você esse projeto seria inviável.

Aos colegas Hellen Kuasne, Mateus de Camargo Barros e Fernanda Bernardi Bertonha pelo empenho e paciência. Vocês sem dúvida foram peças fundamentais desse trabalho.

À minha família e esposa por todo apoio, torcida e orações.

À biblioteca e à pós graduação pela prestatividade e atenção.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Chulam TC. MicroRNAs em pacientes com história familiar de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Apesar da maioria dos casos de câncer de cabeça e pescoço ocorrer de maneira esporádica e geralmente estar relacionada à exposição crônica a álcool e tabaco, a história familiar e a suscetibilidade têm merecido especial interesse nas últimas duas décadas. O objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil clínico e epidemiológico de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e história familiar de câncer, avaliar o perfil de expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico de pacientes com carcinoma epidermópide de cabeça e pescoço (CECP) e história familial de câncer com seus respectivos parentes e checar, a partir da utilização de bancos de dados de miRNAs, os principais genes regulados e suas eventuais relações com neoplasias. Foram selecionados 74 casos usando o banco de dados do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo no período de 2003 a 2011. Os critérios utilizados para caracterizar os casos familiais de CECP foram: 1) dois ou mais parentes de primeiro grau acometidos por CECP ou tumores relacionados; 2) Idade de aparecimento do CECP inferior a 45 anos em pelo menos um dos membros da família; 3) Aparecimento do CECP em qualquer idade em casos com ausência de exposição prévia ao tabaco e álcool ou qualquer outro fator etiológico conhecido. Os tumores considerados como relacionados ao CECP foram aqueles associados com o consumo de tabaco (pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, figado, rim, bexiga, útero e medula óssea) ou outros tumores epiteliais como carcinoma colorretal, mama e melanoma. Foram coletadas amostras de sangue periférico dos probandos e, quando possível, de um de seus parentes acometidos por câncer e realizada a análise de expressão de miRNAs por RT-qPCR. O sítio de tumor mais comum nos probandos foi cavidade oral (42%) seguido de laringe (31.5%). Entre as 74 famílias, o número de parentes afetados foi de 171 sendo 121 de primeiro grau e 50 de segundo e

terceiro graus. Neste grupo havia 19 topografias diferentes de tumores e os mais frequentes foram: cabeça e pescoço (18,6%), mama (16%), cólon (13%), estômago (11%) e útero (11%). Entre parentes de primeiro grau, foram mais comuns, em ordem decrescente, os tumores de mama (17,4%) e cabeça e pescoço (15,7%). Foi verificada a prevalência em irmãos acometidos pela doença (46% dos casos). Utilizando a estratégia de escores, foram identificados 6 microRNAs que podem estar relacionados a casos familiais: hsa-miR-582-3p, hsa-miR-597, hsa-miR-135b, hsa-miR-496, hsa-miR-431 e hsa-miR-517a. Os casos com escores elevados foram comparados com bancos de dados de microRNAs e selecionados para confirmação dos achados. Os hsa-miR-496, hsa-miR-582-3p e hsa-miR-597 são candidatos a regular os genes *TGFBR1*, *PTEN*, *CDH1*, *TNF*, *FGFR4* e *EGFR*. Em conjunto, os dados sugerem que pode haver um perfil de expressão de microRNAs específico e peculiar aos pacientes com história familiar de câncer e que os microRNAs citados, em especial, o hsa-miR-597 e hsa-miR-496 devem ser melhor investigados em estudos subsequentes uma vez que existem poucos dados validados em literatura.

SUMMARY

Chulam TC. [MicroRNAs profile in patients with family history of head and neck cancer]. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Although most cases of head and neck cancer (HNSCC) occur sporadically and generally are related to chronic exposure of alcohol and tobacco, family history and genetic susceptibility have earned special interest in the last two decades. The aims of this study were to characterize the clinical and epidemiological profile of patients with head and neck cancer and family history of cancer, evaluate the expression profile of miRNAs in peripheral blood samples from patients with HNSCC and familial history of cancer with their relatives and check, by using miRNAs databases, the main regulated genes and their possible relationship to cancer. A total of 74 cases were selected through pre-existing databases of the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, AC Camargo Hospital, Sao Paulo from 2003 to 2011. The criteria used to characterize the familial cases of HNSCC were: 1) two or more first degree relatives affected by HNSCC or related tumors, 2) Age of onset of HNSCC less than 45 years in at least one of the family members, 3) Appearance of HNSCC at any age if no prior exposure to tobacco and alcohol or any other known etiologic factor. Tumors considered related HNSCC were those related to tobacco consumption (lung, esophagus, stomach, pancreas, liver, kidney, bladder, uterus and bone marrow) or other epithelial tumors such as colorectal carcinoma, breast and melanoma. Then, peripheral blood samples of these patients were collected and, when possible, of one of them relatives affected by cancer. Subsequently, the evaluation of miRNAs expression was did by RT-qPCR. The most common tumor sites of probands were oral cavity, with 31 cases (42%), followed by the larynx, 24 cases (31.5%). Among the 74 families, the number of affected relatives was 171, with 121 of first-degree and 50 of second and third degree. In this group there were 19 different tumor sites and the most common were: head and neck (18.6%), breast (16%), colon (13%), stomach (11%) and, finally, uterus (11%). Among first-degree relatives, the most common tumors in descending order were: breast (17.4%) and

head and neck (15.7%). By analyzing only the first-degree relatives, the prevalence was found in siblings with 54 (46%) cases. Utilizing scores that could clarify differences between the selected sample and the pool of controls, 6 main miRNAs were identified: hsa-miR-582-3p, hsa-miR-597, hsa miR-135b, hsa-miR-496, hsa-miR-431 and hsa-miR-517a. The cases with high scores were compared with microRNAs databases and those that had relations with important cancer-related genes were selected for confirmation of the findings. Hsa-miR-496, hsa-miR-582-3p e hsa-miR-597 are candidates to regulate genes as *TGFBR1*, *PTEN*, *CDH1*, *TNF*, *FGFR4* e EGFR. In conclusion, the data suggest that there may be an specific and peculiar expression profile of microRNAs in patients with a family history of cancer and that these microRNAs cited, in particular, hsa-miR-597 and hsa-miR-496 should be investigated in subsequent studies once there are few validated data in our literature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das etapas realizadas até a análise de expressão relativa dos miRNAs diferencialmente expressos	25
Figura 2	Heredogramas das 12 famílias selecionadas para a análise de expressão global dos miRNAs	46
Figura 3	Heatmap ilustrando a expressão dos 65 miRNAs	48
Figura 4	As três principais redes gênicas detectadas relacionando os miRNAs (A-C)	59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Características epidemiológicas e clínicas dos 74 casos incluídos no estudo.	32
Tabela 2	Distribuição de tumores entre parentes de primeiro e segundo grau	33
Tabela 3	Distribuição dos tumores entre os parentes de primeiro grau	34
Tabela 4	Características epidemiológicas, clínicas e patológicas de pacientes não tabagistas	37
Tabela 5	Características epidemiológicas, clínicas e patológicas de pacientes não etilistas	38
Tabela 6	Características epidemiológicas, clínicas e patológicas de pacientes não etilistas e não tabagistas	39
Quadro 1	Sessenta e cinco miRNAs com escore igual ou superior a 1 para seis pares de pacientes (paciente e familiar com câncer)	49
Quadro 2	Avaliação <i>in silico</i> de alguns miRNAs com score elevado, os genes potencialmente regulados e as neoplasias em que estas alterações foram descritas	53
Quadro 3	Tabela relacionando os escores encontrados para os miRNAs com suas vias e potenciais relações com síndromes hereditárias	60
Quadro 4	Descrição dos miRNAs e ensaios selecionados para análise de expressão por RT-qPCR	62
Quadro 5	Seis miRNAs selecionados para a confirmação para cinco pares de pacientes previamente avaliados (paciente e familiar com câncer) (escore A)	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CECP Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

CEP Comitê de Ética e Pesquisa

FN Fator de normalização

GST Gene Supressor tumoral

HNSCC Head and neck squamous cell carcinoma

HPV Papilomavírus humanoIC Intervalo de Confiança

IPA Ingenuity Pathways Analysis

miRNA MicroRNA

MMR Mismatch repair

NA Não avaliável

NE Não especificado

OR Odds Ratio

PCR Reação em cadeia da polimerase

RR Risco Relativo

RT qPCR Real time PCR quantitativo

SNC Sistema nervoso central

SNP Single nucleotide polimorphism

STP Segundo tumor primário

TLDA Taqman Low Density Array

TNPCP Tumor não pequenas células de pulmão

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Seleção da casuística	19
3.2	Obtenção e armazenamento de amostras	21
3.3	Obtenção dos heredogramas e seleção de probandos	22
3.4	Extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação por RT-qPCR	22
3.5	Hibridação das amostras no sistema Taqman Human Pool A	23
3.6	Análise dos dados	25
3.6.1	Aplicação de filtros de qualidade para a análise de expressão dos miRNAs.	25
3.6.2	Normalização e obtenção de expressão relativa dos miRNAs	26
3.6.3	Comparação entre as amostras dos pacientes com câncer e a referência	
	normal	28
3.6.4	Análise funcional in silico (Banco de dados de miRNAs preexistentes	
	Software IPA)	28
3.6.5	Validação da metodologia	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Dados clínicos e epidemiológicos	31
4.2	Perfil de expressão de miRNAs	47
4.3	Análise de expressão de MicroRNAs (miRNAs)	62
4.4	Confirmação dos resultados de TLDA	62
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	87

ANEXOS

Anexo 1	Quadros suplementares		
Anexo 2	Ilustração da via de EGFR demosntrando sua importante relação		
	com outras vias importantes como via RAS, AKT, PTEN e		
	mTOR		
Anexo 3	Ilustração da via de TNF		
Anexo 4	Ilustração da via de RAS		
Anexo 5	Termo de Consentimento Pós-informado		
Anexo 6	Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa-CEP		

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas o câncer se tornou a principal causa de morte em diversos países economicamente desenvolvidos. Atualmente representa a segunda causa de morte em muitos países em desenvolvimento. As principais razões para o aumento mundial na incidência do câncer são o crescimento e o envelhecimento populacional além da adoção por parte da população de estilos de vida que aumentam o risco para o surgimento de neoplasias incluindo o tabagismo, etilismo, sedentarismo e dietas ocidentalizadas. Um total de 1.638.910 casos novos de câncer e 577.190 mortes foram previstas para ocorrer nos Estados Unidos em 2012 por SIEGEL. Durante os últimos cinco anos (2004-2008), as taxas gerais de incidência de câncer em homens diminuíram ligeiramente (0,6% por ano) e ficaram estáveis em mulheres, enquanto as taxas de morte por câncer diminuíram em 1,8% por ano nos homens e 1,6% por ano nas mulheres. Destes, 56% dos casos novos e 64% das mortes foram registradas em países em desenvolvimento (SIEGEL 2012).

Excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer de cabeça e pescoço representa hoje a sexta neoplasia maligna mais comum em homens sendo responsável por aproximadamente 3% de todos os tumores nos Estados Unidos. São quase duas vezes mais comuns entre os homens que em mulheres sendo mais frequentes em pessoas com idade superior a 50 anos. Em 2011, dados do *American Cancer Society*-ACS revelaram a estimativa de 52.000 casos de câncer de cabeça e pescoço entre homens e mulheres. De acordo com estimativas do Instituo Nacional de Câncer-INCA, em 2012 eram esperados 14170 novos casos de tumores de

cavidade oral e 6110 novos casos de tumores de laringe em indivíduos do gênero masculino. No Brasil, os tumores de cavidade oral representam o quinto mais frequente entre homens correspondendo a 5,1% do total de neoplasias (Ministério da Saúde 2011).

A doença acomete homens na proporção de 2:1 em relação às mulheres, apesar da incidência desses tumores em mulheres estar aumentando, fato este que está muito provavelmente ligado ao aumento de tabagismo (CURADO e HASHIBE 2009). O tratamento é baseado no estadiamento clínico da doença e no tripé terapêutico: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento unimodal com cirurgia ou radioterapia isolados é reservado para os pacientes com doença em estádios iniciais. Nesses casos, os resultados oncológicos são homogêneos para as duas modalidades de tratamento. Nos casos de tumores diagnosticados em estádios clínicos mais avançados, indicam-se tratamentos combinados com cirurgia, radioterapia e, em algumas situações, quimioterapia. As indicações clássicas de quimioterapia no cenário adjuvante e com respaldo na literatura são: extravasamento capsular linfonodal e/ou margens comprometidas. A partir da década de 1990 começaram a surgir os protocolos de preservação de órgãos baseados em radioterapia e quimioterapia, selecionados para o tratamento inicial de algumas topografias da cabeça e pescoço, principalmente tumores de laringe, hipofaringe e orofaringe (Anonymous 1991; SPAULDING et al. 1994; ANDREWS et al. 2011).

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo heterogêneo de tumores malignos que ocorre no trato aerodigestivo superior, a maioria (93%) dos quais do subtipo histológico carcinoma de células escamosas. A sobrevida global em cinco anos é de cerca de 60% entre os pacientes tratados e tem se mantido praticamente

inalterada ao longo das últimas duas décadas (CARVALHO et al. 2005). Apesar dos avanços no tratamento dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP) tem sido documentada uma redução na sobrevida dos pacientes com câncer de laringe (CARVALHO et al. 2005), e apenas um ligeiro ganho em sobrevida nos pacientes portadores de câncer de cavidade oral. O aumento significativo nas taxas de sobrevida foi observado entre os pacientes portadores de câncer de nasofaringe e orofaringe (CARVALHO et al. 2005; FULLER et al. 2007).

Os principais fatores de risco que contribuem para o CECP são: uso do tabaco, consumo de álcool, dieta e infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (BLOT et al. 1988; FRANCO et al. 1989; RODRIGUEZ et al. 2004; FURNISS et al. 2007; HASHIBE et al. 2009). A ocorrência de tumores de orofaringe associados ao HPV tem aumentado, principalmente entre jovens não tabagistas e não etilistas (DAHLSTROM et al. 2008). Em um estudo recente, KAMINAGAKURA et al. (2012) mostraram que 32% e 8% dos carcinomas orais de células escamosas são HPV positivos entre o grupo de pacientes jovens e idosos, respectivamente. Estudo sueco realizado em 2008 por HUSSAIN et al. evidenciou um aumento significativo do risco de câncer de colo uterino relacionado ao HPV em pacientes com parentes de primeiro grau acometidos por tumores de orofaringe (RR: 3.17). Esse estudo correlaciona familiares com tumores HPV relacionados incluindo colo de útero, anorretais e tumores de vias aerodigestivas superiores (HUSSAIN et al. 2008).

RODRIGUEZ et al. (2004) relataram que há um aumento em 20 vezes no risco de desenvolver carcinomas orais e da faringe em indivíduos com menos de 46 anos e tabagistas, e um risco cinco vezes maior para os consumidores frequentes de álcool. Os autores também relataram um aumento do risco de quase 50 vezes nos

pacientes usuários de álcool e tabaco, sugerindo o potencial sinergismo existente entre essas substâncias.

Outros fatores atualmente têm sido objeto de investigação científica, tendo em vista o crescente aumento na incidência desse tipo de neoplasia entre indivíduos jovens, não tabagistas e não etilistas (DAHLSTROM et al. 2008; O'REGAN et al. 2008). Além disso, casos familiares têm sido cada vez mais estudados por diversos grupos (BONDY et al. 1993; FOULKES et al. 1996; YU et al. 1999; ZHU et al. 2002; SUÁREZ et al. 2006; GARAVELLO et al. 2008; NEGRI et al. 2009).

Apesar da maioria dos casos de CECP ocorrer de maneira esporádica e geralmente estar relacionada à exposição crônica ao álcool e tabaco, a história familiar e a predisposição genética têm merecido especial interesse nas últimas duas décadas. Avanços importantes no entendimento da predisposição hereditária do CECP vêm ocorrendo de forma progressiva. Estima-se que cerca de 5 a 10% das neoplasias ocorrem por herança autossômica dominante envolvendo um gene de alta penetrância (NAGY et al. 2004).

Os casos com história familial de tumores de cabeça e pescoço ainda são pouco divulgados em estudos epidemiológicos. Alguns estudos demonstraram um risco aumentado de desenvolver câncer de cabeça e pescoço em familiares de primeiro grau de pacientes acometidos por esses tumores principalmente para subsítios anatômicos mais distais como laringe e hipofaringe e nos pacientes expostos ao tabaco. Estes achados demonstram que, a herança genética associada com a exposição aos fatores ambientais pode explicar a presença de parentes afetados com câncer em membros destas famílias e demonstrar uma associação entre história familial positiva como fator de risco em CECP (NEGRI et al. 2009).

GARAVELLO et al. (2008) relataram forte associação entre história familial de carcinomas epidermóides de faringe e laringe e um risco aumentado na presença de dois ou mais parentes acometidos. Em um estudo caso-controle foi demonstrado um risco relativo de aproximadamente três vezes quando se correlacionou história familiar e tumores do trato aerodigestivo superior (COPPER et al. 1995). Em outro estudo realizado no Canadá esse risco foi estimado em 3,79 vezes (FOULKES et al. 1996). A grande crítica a esses estudos recaiu na dificuldade do acesso às informações referentes à história clínica dos familiares acometidos e à comprovação histopatológica dos tumores nesses indivíduos que, de fato, ocorre devido à falta de documentação adequada que confirme o tipo tumoral e a ausência de uma história clínica detalhada de um número significativo de familiares.

Dessa forma, entendendo que a etiologia hereditária dos CECP não é completamente estabelecida, alguns estudos relacionam a predisposição genética ao desenvolvimento destes tumores (CLOOS et al. 1996; ZHU et al. 2002) utilizando a sensibilidade a mutágenos como marcador de risco. A análise da sensibilidade a mutágenos foi idealizada por HSU et al. (1985). Por este método, quantifica-se as quebras cromatídicas após exposição de culturas de linfócitos à bleomicina. Essa metodologia foi utilizada por CLOOS et al. (1996), além de outros pesquisadores (SCHANTZ e HSU 1989; SPITZ et al. 1993). Os resultados deste estudo revelaram que a sensibilidade aos mutágenos está incluída entre os fatores de risco na carcinogênese, uma vez que os pacientes com menor capacidade de reparo celular eram aqueles que desenvolveram os tumores. O primeiro estudo com essa metodologia foi realizado com 46 pacientes portadores de CECP e 39 controles demonstrando significativa diferença entre os grupos (72% versus 28%) e

estabelecendo que a hipersensibilidade aos mutágenos estaria fortemente ligada ao aumento do risco de desenvolvimento de CECP, mesmo após o ajuste referente à exposição para álcool e tabaco (SCHANTZ e HSU 1989). Resultados semelhantes foram encontrados por SPITZ et al. (1993) em estudo caso-controle com 108 casos e 108 controles.

Somado a isso, FOULKES et al. (1995), em estudo colaborativo multiinstitucional realizado no Brasil, estabeleceram o papel da história familiar como fator de risco para o desenvolvimento de CECP e, desde então, outros estudos têm adicionado evidências a estes achados.

Considerando a relação entre a capacidade de reparo celular e o potencial genético herdado, passou-se a correlacionar a história familiar com a sensibilidade aos mutágenos (BONDY et al. 1993). Alguns estudos demonstraram que pacientes portadores de CECP com sensibilidade aos mutágenos mais exuberante apresentavam maior número de parentes acometidos pela doença sugerindo a possibilidade de um componente hereditário envolvido no risco de desenvolvimento da doença (BONDY et al. 1993; ZHU et al. 2002).

GOLDSTEIN et al. (1994) examinaram a relação entre a história familiar de câncer e risco de câncer de boca e faringe utilizando para isso dados epidemiológicos de um estudo caso-controle. Depois de controlar os dados por idade, raça, sexo, grau de instrução, tabagismo e etilismo, as chances de risco (OR, do inglês *odds ratio*) associadas com qualquer tipo de câncer na família foram de 1,1 (95% (IC) 0,9-1,3). Além disso, um risco elevado de câncer oral/orofaringe foi encontrado entre aqueles cujos irmãos desenvolveram outros tipos de câncer (OR = 1,6, IC 95% 1,1-2,2). Avaliando os subsítios, observou-se um risco maior para tumores tabaco-

relacionados nos parentes de pacientes portadores de tumores de faringe em comparação com os de cavidade oral (OR = 1,7, IC 95% 1,1-2,8). Os dados indicaram que deve haver algum grau de agregação familiar entre os portadores de câncer oral/faringe. Além disso, uma vez que o risco familiar de câncer de orofaringe/cavidade oral foi associado com tumores relacionados ao tabaco entre parentes do sexo masculino, mas não no feminino, parece provável que os fatores ambientais (tabagismo e etilismo) contribuem para a suscetibilidade familiar observada neste estudo.

Em 1995, COPPER et al. estudaram parentes de primeiro grau de pacientes com tumores de cabeça e pescoço recém diagnosticados e utilizaram os parentes de primeiro grau dos cônjuges dos pacientes como controles. Entre os parentes de primeiro grau (n = 617) dos 105 pacientes com câncer de cabeça e pescoço observouse 31 casos de câncer do trato aerodigestivo superior contra apenas 10 casos no grupo controle (n = 618) (RR = 3,5; p = 0,0002). Esta taxa elevada de câncer foi ainda maior em irmãos (16 *versus* 2, RR =14,6; p = 0,0001). Os autores concluíram que a predisposição genética é um importante fator de risco para o carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.

Em outro estudo, em 1996, FOULKES et al. destacaram que o risco relativo ajustado para o CECP foi 7,89 (intervalo de confiança de 1,50 a 41,6) em parentes de primeiro grau de pacientes com múltiplos tumores de cabeça e pescoço sugerindo que fatores genéticos são importantes na etiologia dessa neoplasia, especialmente para pacientes com tumores múltiplos.

YU et al. (1999) demonstraram que as OR associadas com três ou mais parentes de primeiro grau com câncer em qualquer topografia foram 3,79 (IC 95%;

0,9-15,9), com uma tendência de aumento linear do risco (p = 0,040), após ajuste para idade, sexo, escolaridade, renda familiar, tabagismo e etilismo. Também neste estudo, o risco foi significativamente maior quando havia uma história positiva de neoplasia entre irmãos (OR = 2,61, 1,2-5,6; p = 0,014). Pacientes com história familiar de câncer e maior sensibilidade a mutágenos estavam sob risco mais elevado (OR = 7,88, 2,5-25,3; p= 0,005), indicando um efeito aditivo e interativo. Os resultados desse grupo também sugerem que a influência genética familiar pode ter um papel importante no câncer de cabeça e pescoço.

Em um estudo mais recente, NEGRI et al. (2009) relataram que fatores familiares podem desempenhar um papel importante na etiologia dos CECP e sugeriram que pacientes com e sem história familiar de CECP devem evitar o consumo do tabaco e a exposição ao álcool, sendo estas indicadas para prevenir o surgimento da doença.

Em um artigo interessante, DE ANDRADE et al. (1998) utilizando o software SAGE, demonstraram que o modelo Mendeliano deve ser valorizado em CECP e que não é correto postular uma causa puramente ambiental para o desenvolvimento desses tumores. Este modelo sugere que 18% da população que fuma e bebe é suscetível ao risco de desenvolvimento da doença; para não-tabagistas e não-etilistas que são heterozigotos para o alelo suscetível, este valor é próximo a zero. Caso contrário, para os heterozigotos que fumam e bebem o risco é de 14% aos 70 anos. Estes resultados sugerem que fatores genéticos são responsáveis por uma fracção significativa do risco de desenvolvimento de CECP associado com a história familiar destes tumores.

BROWN et al. (2001) relataram que o risco de desenvolvimento do câncer de cavidade oral foi maior em indivíduos com parentes de primeiro grau com câncer de cavidade oral (OR = 2,5; IC = 0,8-8,0) ou qualquer tumor de vias aerodigestivas superiores (OR = 2,6; IC = 1,4-4,8). O aumento do risco associado com história familiar foi mais elevado para indivíduos expostos a fatores de risco conhecidos (tabagismo, etilismo pesado e consumo irregular de frutas e vegetais crus) e com diagnóstico de carcinoma oral em idades mais jovens do que 65 anos. Estes resultados favorecem a hipótese da existência de um componente hereditário, embora fatores de risco relacionados ao estilo de vida também estejam envolvidos.

O achado mais recente e atualmente explorado pelas diversas correntes da oncologia são os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs correspondem a pequenas sequências de 20 a 25 nucleotídeos, codificados por genes específicos, os quais atuam na regulação da expressão de RNAs mensageiros (mRNAs) pela repressão da tradução ou degradação do mRNA (GROSSHANS e FILIPOWICZ 2008). Segundo o banco de dados mirBase, estão descritos 1921 miRNAs no genoma humano (13/12/2012 – www.mirBase.org). Os miRNAs tem um importante papel em processos biológicos normais como desenvolvimento, apoptose, diferenciação e proliferação celular, contribuindo também com o início e desenvolvimento de diversos tipos tumorais, se tornando um componente importante em pesquisas de câncer (COWLAND et al. 2007; WIJNHOVEN et al. 2007). São sintetizados a partir da RNA polimerase II e modificados estruturalmente de modo a se assemelharem a uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) mas sem a capacidade de codificação de proteínas (COWLAND et al. 2007). São capazes de regular simultaneamente múltiplos genes codificadores (FABBRI et al. 2013). Recentemente, inúmeros

estudos têm investigado a capacidade destas moléculas em regular funções celulares importantes e o mecanismo pelo qual elas atuariam no desenvolvimento de diversos tumores.

Apesar do número elevado de miRNAs descritos, apenas algumas dessas micromoléculas teriam poder funcional na regulação de genes. Dessa forma, modulando a codificação protéica de forma positiva ou negativa, ditariam a *performance* dos mRNAs (COWLAND et al. 2007; GOMES e GOMEZ 2008; HOSHINO e MATSUBARA 2012; HERMEKING 2012).

Partindo do conceito que o câncer é uma doença com fundamentação genética e epigenética e que depende diretamente da ativação de proto-oncogenes ou inativação de genes supressores de tumores, os miRNAs, quando funcionalmente ativos, podem atuar como moduladores desses genes estabelecendo diretamente uma relação entre a sua expressão e o surgimento de determinados tipos de neoplasias.

Existem vários relatos indicando que os miRNAs representam uma nova classe de moléculas envolvidas na tumorigênese, sendo diferencialmente expressos, inativados, amplificados ou mutados em cânceres humanos (CALIN et al. 2002; 2004, 2006; MICHAEL et al. 2003; METZLER et al. 2004; TAKAMIZAWA et al. 2004; JOHNSON et al. 2005; EIS et al. 2005; GREGORY e SHIEKHATTAR 2005; ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006; HOSHINO e MATSUBARA 2012; HERMEKING 2012) podendo, portanto, funcionar como oncogenes ou genes supressores de tumores.

A expressão desregulada de certos miRNAs tem sido associada com doenças proliferativas humanas, como leucemia (LAGOS-QUINTANA et al. 2003; CALIN et al. 2004; GARCÍA-ORTÍ et al. 2012), câncer de mama (IORIO et al. 2005;

BIAGIONI et al. 2012), glioblastoma multiforme (CIAFRÉ et al. 2005, WU et al. 2012), carcinoma hepatocelular (MURAKAMI et al. 2006), carcinoma papilífero de tireóide (HE et al. 2005; BUDA et al. 2012), câncer de pulmão (TAKAMIZAWA et al. 2004; YANAIHARA et al. 2006; VOLINIA et al. 2006; LI et al. 2012), carcinomas de estômago e cólon (MICHAEL et al. 2003; YANG et al. 2012), tumores pancreáticos (NAKATA et al. 2011) e tumores de cabeça e pescoço (MA et al. 2012; HSU et al. 2012), entre outros. Os miRNAs comumente alterados em diferentes tipos tumorais apontam para seu envolvimento em vias reguladoras fundamentais pela regulação de genes codificadores de proteínas câncer-específicas (VOLINIA et al. 2006).

A família de miRNAs let-7 tem sido relacionada com várias neoplasias. A diminuição na expressão de miRNAs dessa família foi associada ao aumento da expressão do gene RAS, uma molécula oncogênica ligada a vários tipos tumorais como tumores de pulmão, cólon, estômago e cabeça e pescoço, além de estar associada a um pior prognóstico (JÉRÔME et al. 2007; GOMES e GOMEZ 2008). TRAN et al. (2007) avaliaram 261 tipos de miRNAs em nove pacientes com CECP nas topografias de hipofaringe, língua, laringe e amígdala. O estudo foi realizado utilizando uma plataforma de oligonucleotídeos. Foi identificado o aumento da expressão de 33 miRNAs nessas amostras e 22 miRNAs apresentaram diminuição de expressão. Um exemplo de miRNA com expressão aumentada foi o miR-21 que também se apresenta com expressão aumentada em outras neoplasias como glioblastomas e câncer de mama. Em contrapartida, quando comparados aos tumores de pulmão, mama, cólon, próstata e pâncreas, apenas os tumores de cabeça e pescoço apresentaram aumento na expressão do miR-205r. Os autores sugeriram que devido à

falta da comparação dessas células tumorais com as normais, há a necessidade de estudos adicionais para a identificação de miRNAs específicos em tumores de cabeça e pescoço.

Alguns estudos atuais mostram a relação entre o câncer familial e miRNAs. Em 2010, SHEN et al. relataram que os miRNAs desempenham um papel crítico na tumorigênese, mas ainda desconheciam se variações na expressão desses miRNAs levariam à predisposição ao câncer. Considerando o fato de que os miRNAs regulam uma série de GST e oncogenes, variações genéticas dos miRNA poderiam afetar os níveis de expressão de oncogenes ou GSTs e, consequentemente, alterar o risco de desenvolvimento do câncer. Para testar esta hipótese, SHEN et al. (2010) selecionaram 30 miRNA (avaliados a partir de amostras de DNA obtidas de linfócitos do sangue periférico) em 83 pacientes com câncer de ovário familial, que são conhecidamente reguladores de genes relacionados a este tipo tumoral e que estão alterados no tecido tumoral ovariano. Nenhuma paciente era portadora de mutações conhecidas em BRCA1 ou BRCA2 ou possuíam mutações em genes de reparo a danos no DNA, tais como MLH1 e MSH2 (MMR). Os autores relataram sete novas variantes genéticas em quatro miRNAs precursores. Entre elas, três variantes raras foram encontradas no precursor de miR-191. Em ensaios funcionais, uma das variantes localizada no precursor de miR-191 resultou em alterações fundamentais do ponto de vista estrutural e funcional, e, consequentemente, promoveu a alteração nos níveis de expressão de miR-191 maduro. Os autores relataram que esta variante particular existia em cinco familiares que tiveram câncer do ovário. Os achados sugeriram que pode haver novas variantes genéticas de miRNAs, e que certas variantes poderiam afetar a expressão de miRNAs maduros e, consequentemente,

alterar a regulação de GST ou oncogenes. Além disso, nesse estudo em particular, uma dessas variantes pode estar diretamente associada com o risco de desenvolvimento de câncer de ovário nos familiares.

Em um estudo recente, SHEN et al. (2012) avaliaram os perfis de expressão de microRNAs em linhagens de células linfoblastóides de 74 mulheres com câncer de ovário familiar e 47 controles. Os autores relataram que os casos e controles poderiam ser agrupados usando 95 miRNAs diferencialmente expressos com 91% de acurácia. Para avaliar as implicações potenciais dos miRNAs em câncer de ovário, o grupo investigou as associações entre a expressão de miRNAs e sete variantes de risco de câncer de ovário descritas a partir de um grande estudo de associação genômica (GWAS - Genome Wide Association Study). O GWAS avalia variantes genéticas geralmente utilizando análises de SNPs – single nucleotide polymorphisms, em diferentes indivíduos portadores de doenças ou fenótipos específicos. Nesse estudo (SHEN et al. 2012) as variantes estudadas foram: rs3814113 (9p22.2), rs2072590 (2g31), rs2665390 (3g25), rs10088218, rs1516982, rs10098821 (todas as três em 8q24.21) e rs2363956 (19p13) (SONG et al. 2009; GOODE et al. 2010). Foram descritas 130 associações significativas entre os SNPs e o risco de desenvolvimento de câncer de ovário. Quando comparadas com outras variantes de risco, rs3814113 e rs2072590 tiveram o maior número de associações significativas (68 e 37, respectivamente). Curiosamente, 14 microRNAs que foram associados com aumento do risco de câncer de ovário pertenciam a cinco clusters. Clusters de miRNAs podem ser definidos de forma objetiva como o conjunto de dois ou mais miRNAs que são transcritos a partir de genes codificadores que são vizinhos ou distam até 3000 nt um do outro (ALTUVIA et al. 2005). Nesse estudo, o cluster mais

importante foi o do miR-17-92 com cinco microRNAs, todos relacionados à rs3814113. Analisando as vias biológicas, várias foram significativamente representadas, como por exemplo a via de resposta celular ao stress ($p = 2,87 \times 10$ (-06)).

COZZOLINO et al. (2012) descreveram uma análise minuciosa de miR-34a em 62 pacientes com melanoma cutâneo familiar negativos para alterações no gene CDKN2A/CDK4. Neste estudo, tais pacientes foram submetidos a uma investigação para mutações germinativas no miR-34a. Oito variantes novas de miR-34a foram identificados tanto em heterozigotos (c. 259 G> A, c. 424 G> A, c. 1465 C> T, c. 1769 C> T, c. 2.456 T> G, c. 2603 C> T, c. 2.972 T> A, c. 3069 T> C) como em homozigotos (c. 424 G> A, c. 1465 C> T, c. 1769 C> T). Uma triagem molecular foi então realizada em 150 controles de uma população saudável que demonstrou que tais polimorfismos seriam comuns. No entanto, foram detectados diferenças estatisticamente significativas de frequências genotípicas e alélicas para c. 1465 C> T e c. 1769 C> T, e valores limítrofes foram achados para c. 2.456 T> G. Ao estratificar pacientes no que diz respeito a características clínicas (presença/ausência de melanomas múltiplos, espessura de acordo com a escala de Breslow, fotótipo e número de nevos) não houve associações com significância estatística com exceção de uma associação entre o c. 424 G> A (heterozigoto indivíduo GA) e a presença de melanoma múltiplo e fotótipo III-IV. Em estudo preliminar do grupo, os autores sugeriam um papel tardio do miR-34a na tumorigênese mas não no aumento da suscetibilidade familiar para melanoma cutâneo (PEDACE et al. 2011).

Em 2010, PASTRELLO et al. avaliaram o papel de variantes alélicas de miRNAs na suscetibilidade ao câncer de mama e ovário familiares em pacientes

negativas para mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. Especificamente, os autores avaliaram os miR-146a, miR-17 e miR-369, com base no seu potencial em regular BRCA1 ou BRCA2 e pelo fato de estarem mapeados em regiões cromossômicas comumente deletadas nesses tumores. A análise foi realizada em 101 probandas italianas com história familiar comprovada para câncer de mama e ovário e para alterações de BRCA1 e BRCA2. Nenhuma variante alélica foi detectada para hsa-mir-17 e hsa-mir-369. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) foram comparados com os de 155 controles da mesma população a partir da avaliação de sangue periférico, descartando um papel para variações genéticas nestes três miRNAs como determinantes na predisposição ao câncer de mama e ovário nas pacientes BRCA1/BRCA2-negativas. Por outro lado, o estudo sugeriu que o SNP do mir-146a pode ter impacto sobre a idade de início do câncer. De fato, os indivíduos com genótipos GC ou CC de mir-146a desenvolveram tumores em idade mais jovem em comparação com indivíduos com o genótipo GG. Assim, estes dados apóiam a hipótese de SHEN et al. (2008) de que existe uma associação entre o alelo C do hsamiR-146a e o aparecimento precoce dessas neoplasias.

LIU et al. (2010) estudaram polimorfismos comuns em pré-miRNAs a partir de coleta de sangue periférico para avaliar a associação destes, individualmente ou (mais provavelmente) em conjunto, com o risco de CECP. Os autores avaliaram 4 polimorfismos comuns (hsa-mir-146a, hsa-mir-149, hsa-mir-196a2 e hsa-mir-499) em 1109 pacientes com CECP (casos) e em 1130 pacientes sem doença (controles) de uma população específica controlada por idade e sexo. O grupo concluiu que os quatro SNPs comuns em pré-miRNAs foram associados significativamente com um risco aumentado de CECP.

YANG et al. (2010) estudaram o SNP rs895819 localizado no pré-miRNA-27a. Em uma grande coorte realizada a partir da coleta de sangue de pacientes portadores de câncer de mama familial e 1422 controles saudáveis. Os autores relataram que este polimorfismo foi encontrado de forma muito mais frequente em controles que em casos, indicando um risco reduzido de câncer de mama familiar nos pacientes portadores da variante (G) *versus* (A) (OR = 0,88, 95% IC: 0,78-0,99, p = 0,0287).

CATUCCI et al. (2010) avaliaram SNPs em amostras de sangue periférico nos miR-146a, miR196a2 e miR-499, em casos familiares de câncer de mama provenientes da Alemanha e Itália e não encontraram nenhuma associação entre tais polimorfismos e o risco de câncer de mama ou a idade de início do câncer.

O conceito de uma síndrome familial do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço idealizado por esse estudo é relativamente novo, tendo em vista a escassez de dados de tal entidade na literatura médica. A falta de dados confirma a motivação e a necessidade de estudos detalhados sobre essa entidade clínica. Mesmo entre os médicos, a suspeita clínica de uma síndrome familial de câncer de cabeça e pescoço é baixa e a coleta de dados precisos e detalhados no que diz respeito à história familiar de câncer, não é sistemática. A definição e a aceitação clínica de uma síndrome familial relacionada ao CECP vai avançar a pesquisa e a compreensão de sua prevalência e, acima de tudo, beneficiará diretamente pacientes pela possibilidade de realização de aconselhamento genético eficaz e intervenção precoce em casos com risco (YU et al. 2002). Dessa forma, o presente estudo objetiva avaliar o papel e o perfil de expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico de pacientes com história familial de CECP comparados com amostras de pacientes saudáveis sem

câncer, história familiar de câncer ou doenças crônicas. Também se pretende comparar o achado com os resultados de bancos de dados em miRNAs, vias moleculares ou sinalizadores para contribuir para o conhecimento dos miRNAs na suscetibilidade ao CECP .

2 OBJETIVOS

- ♣ Descrever o perfil clínico, epidemiológico e patológico de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e história familiar de câncer, admitidos no Hospital AC Camargo no período de 2003 a 2011;
- ♣ Avaliar o perfil de expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico de pacientes com CECP e história familial de câncer com seus respectivos parentes, com intuito de identificar potenciais miRNAs candidatos ao aumento de risco da doença;
- ♣ Checar, a partir da utilização de bancos de dados de miRNAs, os principais genes regulados e suas eventuais relações com neoplasias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DA CASUÍSTICA

Os casos foram selecionados prospectivamente (casos novos) e retrospectivamente usando os bancos de dados pré-existentes no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo. Foram selecionados 140 pacientes dos quais 74 pacientes preenchiam os critérios determinados pelo estudo. Todos eram portadores de carcinoma epidermóide de vias aerodigestivas superiores com história familiar de câncer, não tratados previamente em outro serviço, e que foram submetidos ao tratamento com finalidade curativa. Esses pacientes foram admitidos no hospital no período de 2003 a 2011

Com objetivo de estabelecer critérios para avaliar uma possível síndrome de câncer familial associada a tumores de cabeça e pescoço, a seleção de pacientes obedeceu a critérios já adotados em literatura para a Síndrome de Lynch, que hoje é muito bem definida (Amsterdam I – VASEN et al. 1991; Amsterdam II – VASEN et al. 1999 e posteriormente Bethesda – RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997; UMAR et al. 2004). Os critérios utilizados para caracterizar os casos familiais de CECP foram:

1) dois ou mais parentes de primeiro grau acometidos por CECP ou tumores relacionados; 2) Idade de aparecimento do CECP inferior a 45 anos em pelo menos um dos membros da família; 3) Aparecimento do CECP em qualquer idade em casos com ausência de exposição prévia ao tabaco e álcool ou qualquer outro fator

etiológico conhecido. Foi adotado o critério de NEGRI et al. (2009) para os tumores relacionados ao CECP que compreende aqueles associados ao consumo de tabaco incluindo pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, fígado, rim, bexiga, útero e medula óssea ou outros tumores epiteliais como carcinoma colorretal, mama e melanoma. O termo câncer relacionado foi utilizado baseado também em um estudo prévio do grupo com 252 pacientes cujos dados clínicos e epidemiológicos estavam completos em 134 casos (BÉRGAMO et al. 2005). Nessa análise 52/134 pacientes apresentavam história de câncer na família e os principais tipos tumorais encontrados nos familiares após várias análises isoladas (incluindo análises em irmandades, com mais de um parente afetado na família, hábitos tabagista e etilista, idade ao diagnóstico) eram tumores de cabeça e pescoço, estômago, pulmão, mama e cólon. Os pacientes selecionados para o estudo obrigatoriamente apresentavam o primeiro critério. Apenas dois casos apresentavam exclusivamente o terceiro critério e foram selecionados por desenvolveram tumores em idade jovem (18 e 28 anos). Doze casos apresentavam dois critérios de inclusão; em muitos casos não foi possível obter a idade ao surgimento do tumor.

Foram excluídos os casos de carcinomas de lábio, nasofaringe, tireóide e glândulas salivares assim como doenças sistêmicas associadas com a predisposição ao câncer como a epidermólise bolhosa, xeroderma pigmentoso, papilomatose juvenil e anemia de Fanconi.

Foram revistos todos os dados referentes à localização da lesão, estadiamento clínico, terapêuticos e evolução clínica até o óbito ou última revisão ambulatorial para os 74 casos incluídos no estudo. Entre os casos incluídos no estudo, foram selecionados 12 probandos para análises de expressão de miRNAs em amostras

obtidas de linfócitos de sangue periférico. Todos os familiares, com ou sem câncer, que voluntariamente aceitaram participar do estudo foram incluídos após conhecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico (em Anexo). A comprovação histopatológica dos casos familiais foi realizada, quando possível, pela pesquisa em prontuários médicos, laudos da anatomia patológica ou atestados de óbito. Foram coletados 20 mL de sangue periférico de cada um dos pacientes e familiares. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo, São Paulo (1200/09 – em Anexo).

3.2 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Inicialmente foi realizada a coleta de sangue periférico de cada um dos pacientes e familiares. Foi também realizada a coleta de sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis que não apresentavam história pessoal ou familiar de câncer ou doenças crônicas conhecidas. Estes casos foram utilizados como referência normal do estudo. As amostras de sangue foram coletadas e devidamente armazenadas em tubos Paxgen Blood RNA (QIagen), utilizados para a coleta de sangue a vácuo que mantém a estabilidade das moléculas de RNA. A principal dificuldade nessa etapa do estudo foi a inclusão de familiares afetados vivos dos pacientes acometidos por CECP.

3.3 OBTENÇÃO DOS HEREDOGRAMAS E SELEÇÃO DE PROBANDOS

A história familiar foi obtida por meio de entrevistas com os pacientes e/ou seus familiares para a construção dos heredogramas de todos os casos selecionados. Entre esses pacientes, foram selecionados os probandos que apresentavam maior probabilidade de serem portadores de uma síndrome familial. Esta seleção foi baseada no maior número de critérios adotados no estudo e do número de grau de parentesco dos parentes afetados (seis casos). Foram selecionados também seis pacientes que possuíam familiares com história de câncer que estavam vivos e sendo, portanto, possível a coleta de amostras de sangue periférico.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E AVALIAÇÃO POR RT-qPCR

Foi realizada a extração do RNA pelo kit PAXgene Blood miRNA (Qiagen) e quantificado o ácido nucleico obtido em espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade). Todas as amostras foram estocadas em freezer a -80°C para serem utilizadas na quantificação da expressão de microRNAs (miRNAs) pelo sistema *TaqMan Human MicroRNA Assay* Set v2.0 (*Applied Biosystems*) utilizando o 7900 *HT Fast Real Time PCR* (*Applied Biosystems*).

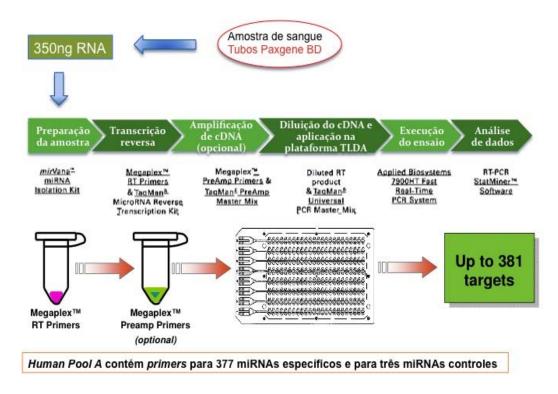
Para a síntese de cDNA foi utilizado um conjunto de iniciadores prédefinidos desenhados de forma a manter a estrutura em *loop* (*Megaplex*TM *RT Primers, Applied Biosystems*). Este sistema permite a ligação dos iniciadores a

centenas de miRNAs alvos em um único experimento e reduz o número de reações de transcrição reversa e a quantidade de RNA necessária para as reações. O *pool* de iniciadores *Megaplex RT* (*Human Pools A*) foi utilizado para os ensaios com as plataformas de *array*. O Kit *Megaplex*TM *RT Primers*, *Human Pool A* contém iniciadores para 377 miRNAs específicos e para três miRNAs controles. Essa tecnologia supera um problema crucial na quantificação de miRNAs, o tamanho pequeno dos miRNAs maduros (~22 nt), que impede o delineamento convencional de iniciadores para RT. Para a síntese de cDNA foi utilizado 3 μL (350ng) de RNA total e 4,5 μL do mix de reação *Megaplex*TM *RT Primers* A (*Applied Biosystems*) em um volume final de 7,5μL de reação por amostra, segundo as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). A reação de transcrição reversa e a análise de expressão provêem a especificidade para os miRNAs maduros, bem como a discriminação de um único nucleotídeo entre seqüências muito próximas de uma mesma família.

3.5 AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PELO SISTEMA *TAQMAN*HUMAN POOL A

Uma vez convertido em cDNAs, esses miRNAs foram submetidos a uma etapa de amplificação utilizando o Kit *Megaplex*TM *PreAmp Primers Human Pool A* e *TaqMan*® *Master Mix* (Applied Biosystems). A análise de expressão global foi realizada na plataforma A descrita previamente (contendo um total de 377 ensaios *TaqMan*® *MicroRNA*). Nessa plataforma estão incluídos três controles endógenos que foram utilizados na normalização dos dados e um controle negativo não

relacionado a humanos. Cada placa contém iniciadores e sondas específicas, capazes de detectar um miRNA particular entre os 377 presentes na plataforma. Para a PCR foram adicionados 450μL de *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix, No AmpErase*® *UNG*, 2X (*Applied Biosystems*), 6μL do produto *amplificado* e 444μL de água ultrapura estéril. Após agitação cuidadosa e centrifugação, um volume de 100 μL do produto da PCR foi transferido para a plataforma *TaqMan MicroRNA Array* as quais são conectadas por canais de microfluidos até os 48 *micro-wells* que contém os *primer/probe TaqMan* liofilizados. A plataforma foi centrifugada duas vezes por 1 minuto a 1200 rpm (306g), a 4°C, para distribuir o produto uniformemente a cada um dos *micro-wells*. A plataforma foi selada e levada ao *Biosystems Prism 7900HT Fast Real-Time PCR sequence detection System (Applied Biosystems)* para quantificar os níveis de expressão de cada miRNA. As condições da PCR foram as que seguem: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 94,5°C, 30 segundos a 97°C, 1 minuto a 59,7°C durante 40 ciclos. A Figura 1 é representativa do método utilizado no estudo.



Adaptado Apllied Biosystems

Figura 1 - Representação esquemática das etapas realizadas até a análise de expressão relativa dos miRNAs diferencialmente expressos.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

3.6.1 Aplicação de filtros de qualidade para a análise de expressão dos miRNAs

Os resultados obtidos pelos ensaios TLDA foram analisados utilizando um conjunto de filtros de qualidade para a triagem dos miRNAs de interesse. O conjunto de parâmetros utilizados foram:

Filtro 1: Cts >38 ou indeterminados foram transformados em 40. Dessa forma, foi padronizado o valor de expressão teoricamente nulo para expressões mínimas ou indetectáveis.

Filtro 2: Se a média geométrica dos valores logarítmicos de Ct dos miRNAs de referência (*MammU6*, *RNU44* e *RNU48*) forem *outliers* inferiores e o Ct do miRNA alvo igual a 40, considerou-se "NA" (não avaliável) para o miRNA alvo, e não expressão nula. Isso porque existe quantidade expressivamente menor de material sendo aplicado em relação às demais amostras e não é recomendado definir como não expresso.

Filtro 3: Se a amostra de referência apresenta Ct = 40 e mais de 50% das amostras alvo também têm Ct = 40 para determinado miRNA, considerou-se "NA" para todas as amostras alvo. Nesse caso desconsiderou-se todo o miRNA, pois não apenas a referência biológica não expressa o miRNA mas também metade das amostras alvo.

Filtro 4: Caso a amostra de referência apresente um Ct diferente de 40 (expressão detectável) e as amostras alvo apresentem Ct = 40 (mesmo que mais de 50% delas), considera-se a negatividade da expressão para as amostras alvo, já que a referência biológica apresenta expressão detectável.

Após o uso dos filtros, a expressão de cada miRNA foi normalizada utilizando a metodologia já descrita anteriormente.

3.6.2 Normalização e obtenção de expressão relativa dos miRNAs

A quantificação relativa de expressão é usada para descrever mudanças na expressão de um gene ou miRNA de interesse em um grupo de amostras em relação a um gene ou miRNA de referência e a uma amostra referência. Foi utilizado como referência um *pool* de 20 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis sem histórico de câncer em parentes de primeiro grau. A normalização foi feita de acordo com a fórmula proposta por PFAFFL (2001):

$$R = \frac{(E+1)alvo^{\Delta Ct \ alvo}}{(E+1)normalizador^{\Delta Ct \ normalizador}}$$

Onde:

E – eficiência de reação de amplificação

alvo - miRNA alvo avaliado

normalizador – miRNA utilizado como normalizador (referência)

ΔCt – diferença entre o Ct obtido para a amostra referência e o Ct obtido para a amostra em análise.

Foi considerada a eficiência de amplificação igual a 100% (exatamente uma duplicação a cada ciclo) para todos os miRNAs avaliados (E=1). A expressão de *MammU6*, *RNU44* e *RNU48* foi considerada como referência na normalização, utilizando a média geométrica dos valores de expressão relativa como fator de normalização (FN):

$$R = \underbrace{(E+1)alvo}_{\Delta Ct \text{ alvo}}$$

$$(E+1)normalizador$$

$$R = \underbrace{2^{\Delta Ct \text{ alvo}}}_{FN}$$

3.6.3 Comparação entre as amostras dos pacientes com câncer e a referência normal

Como critério, a perda de expressão foi definida como 10 vezes menor à expressão da amostra de referência e aumento de expressão como 10 vezes maior à mesma referência. Com a definição de redução e aumento de expressão, foram calculados dois escores, o primeiro (escore A) de forma pareada com o caso e familiar com câncer e o segundo (escore B) com os casos não pareados. No caso da primeira comparação, um escore era acrescentado a cada par com expressão diferencial na mesma direção (expressão aumentada ou reduzida em relação ao controle normal). Dessa forma, o escore A mínimo era de 0 e máximo de 6 (positivo ou negativo de acordo com a direção da expressão), pois foram avaliados seis pacientes e seis familiares correspondentes. O escore B foi calculado com base nos casos onde não foi possível a análise dos familiares (seis casos), com valores também de 0-6 positivo ou negativo. Os miRNAs diferencialmente expressos (escore A >|1|) foram selecionados para análise de redes e vias moleculares com a utilização do software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems).

3.6.4 Análise funcional *in silico* (Banco de dados de miRNAs preexistentes, Software IPA)

Os miRNAs encontrados com expressão diferencial foram submetidos a análises funcionais *in silico* utilizando o *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems, http://www.ingenuity.com). A partir dos resultados obtidos, foram selecionados os miRNAs que apresentaram maiores escores relacionados a expressão e os genes por eles regulados. Em seguida foram avaliados os principais

fenótipos relacionados já descritos em bancos de dados com objetivo de checar o papel funcional destes genes. Os bancos de dados utilizados foram: www.microrna.org / ferrolab.dmi.unict.it/miro/ www.ingenuity.com. Abaixo, está apresentada a descrição de cada etapa das análises funcionais:

Geração de redes: uma lista de genes e miRNAs e o *status* correspondente (valores de expressão gênica) foi importada ao sistema. O IPA identifica cada gene, miRNA e seu *status* e associa-os com as informações depositadas nos bancos de dados. A maioria dos genes e miRNAs é classificada como "moléculas elegíveis para rede". Utilizando algoritmos próprios do IPA, as redes das moléculas elegíveis foram geradas baseadas em suas conexões. Os dados foram representados em valores de *scores* obtidos a partir da presença dos genes importados em relação aos genes do IPA.

Funções biológicas: esta análise identificou as funções biológicas e doenças que foram mais significativamente observadas. O teste exato de Fisher foi utilizado para calcular o *P* valor que determinou a probabilidade de que cada função biológica e ou doença atribuídos a esse conjunto de dados fosse resultante do acaso ou que apresentasse algum significado estatístico. Os dados foram convertidos em —log (*P* valor).

Vias canônicas: esta análise permitiu identificar as vias depositadas no IPA que foram mais significativamente observadas entre os dados importados. A significância da associação entre os dados foram calculadas de duas formas: a) a razão entre o número de moléculas dos dados importados dividida pelo número total de moléculas das vias canônicas; b) teste exato de Fisher foi utilizado para calcular o

P valor que determinou a probabilidade da associação entre os genes e miRNAs importados e as vias canônicas.

Representação gráfica: as redes são representadas graficamente para verificar as relações entre as moléculas. As moléculas são representadas como "nós" e as relações biológicas entre dois "nós" são representadas pelas "linhas". Todas as linhas são baseadas em pelo menos uma referência da literatura ou nas informações canônicas depositadas no banco de dados do IPA. Genes ortólogos são armazenados separadamente no IPA, porém, são representados como "nós" únicos nas redes. No caso dos dados de expressão, variações na intensidade das cores nos "nós" indicam o grau de regulação gênica (vermelho=expressão aumentada e verde=expressão diminuída). Os nós são representados de várias formas geométricas que indicam a classe funcional do produto gênico. As linhas são representadas em duas formas principais, indicando a relação direta e indireta entre os nós.

3.6.5 Validação da metodologia

A partir da seleção dos miRNAs com escores mais elevados, foi realizada a validação técnica dos experimentos. As PCRs foram realizadas no termociclador automático StepOne Plus (Applied Biosystems, Life Technologies), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os miRNAs de referência testados foram *MammU6*, *RNU44* e *RNU48*. Para a análise de expressão do miRNAs foi utilizado o sistema TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) no qual são incluídas sondas marcadas com agentes que emitem fluorescência. Os miRNAs foram amplificados utilizando o TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems – Life Technologies).

4 RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Foram incluídos na pesquisa 74 pacientes portadores de CECP. Todos eles apresentaram pelo menos um parente de primeiro grau afetado por algum tumor relacionado como descrito nos critérios de inclusão anteriormente relatados.

Entre os 74 pacientes, 56 (75%) eram do sexo masculino e 18 do sexo feminino com idade mediana de 60 anos (variando de 18 a 78). Sessenta e três (85%) pacientes eram brancos e 46 (62%) nasceram em áreas urbanas. Em relação à escolaridade, apenas 19% tinham completado o ensino superior. Nesta série, 59 pacientes (80%) eram fumantes e 59 (80%) consumiram algum tipo de bebida alcoólica. O sítio de tumor mais comum foi cavidade oral (31 casos, 42%), seguido de laringe (24 casos, 31,5%), orofaringe (15 casos) e hipofaringe (4 casos). Sete pacientes apresentaram no decorrer do seguimento o surgimento de um segundo tumor primário, três deles em esôfago. Entre os 40 pacientes com dados disponíveis referentes à invasão perineural, 22 não apresentavam tal achado. O conjunto completo de dados epidemiológicos e clínicos é descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Características epidemiológicas e clínicas dos 74 casos incluídos no estudo

Variável	Categoria	Frequência
Gênero	Masculino	56 (75,7)
	Feminino	18 (24,3)
Idade (anos)	≤ 4 5	3
	> 45	71
Raça	Caucasiano	63 (85,2)
	Não Caucasiano	11 (14,8)
Fumante	Não	15(20,3)
	Sim	59(79,7)
Fumante passivo	Não	63(82,5)
•	Sim	13(17,5)
Etilismo	Não	15(20,3)
	Sim	59(79,7)
Topografia	Cavidade oral	31(41,9)
	Orofaringe	15(20,3)
	Laringe	24(32,4)
	Hipofaringe	4(5,4)
Estádio clínico	I	12(16, 2)
	II	11(14,9)
	III	15(20,3)
	IV	36(48,6)
Situação atual	Vivo sem doença	65(87,8)
	Vivo com doença	5(6,8)
	Óbito pela doença	1(1,4)
	Óbito por outras causas	1(1,4)
	Perda de seguimento	2(2,7)

Entre as 74 famílias, o número de parentes afetados foi de 171 sendo 121 de primeiro grau, 40 de segundo e 10 de terceiro grau. Neste grupo havia 19 topografías diferentes de tumores e os mais frequentes foram: cabeça e pescoço (30 casos, 18,6%), mama (26 casos, 16%), cólon (21 casos, 13%), estômago (18 casos, 11%) e útero (18, 11%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição de tumores entre parentes de primeiro e segundo grau.

Local do tumor	Nº casos	(%)	1º Grau	(%)	2º Grau	(%)
Cabeça e pescoço	30	(18,6)	19	(15,7)	11	(27,5)
Mama	26	(16,1)	21	(17,4)	5	(12,5)
Estômago	18	(11,2)	13	(10,7)	5	(12,5)
Esôfago	9	(5,6)	6	(5,0)	3	(7,5)
Cólon	21	(13,0)	14	(11,6)	7	(17,5)
Próstata	8	(5,0)	7	(5,8)	1	(2,5)
Melanoma	1	(0,6)	1	(0,8)		
Pulmão	11	(6,8)	8	(6,6)	3	(7,5)
SNC	1	(0,6)			1	(2,5)
Fígado e vias biliares	3	(1,9)	3	(2,5)		
Tireóide	3	(1,9)	3	(2,5)		
Útero	18	(11,2)	15	(12,4)	3	(7,5)
Pâncreas	5	(3,1)	4	(3,3)	1	(2,5)
Pele	1	(0,6)	1	(0,8)		
Leucemia	1	(0,6)	1	(0,8)		
Rim	1	(0,6)	1	(0,8)		
Bexiga	2	(1,2)	2	(1,7)		
Testículo	1	(0,6)	1	(0,8)		
Abdome*	1	(0,6)	1	(0,8)		

Legenda: * Tumores abdominais sem especificação; SNC: Sistema Nervoso Central

Entre parentes de primeiro grau, foram mais comuns, em ordem decrescente, os tumores de mama (21 casos, 17,4%), cabeça e pescoço (19 casos, 15,7%), útero (15 casos, 12,4%), cólon (14 casos, 11,6%) e estômago (13 casos, 10,7%) (Tabela 2).

Entre os parentes de segundo grau, foram mais freqüentes, em ordem decrescente: os carcinomas de cabeça e pescoço (11 casos, 27,5%), cólon (7 casos, 17,5%), mama (5 casos, 12,5%), estômago (5 casos, 12,5%) e esôfago (3 casos, 7,5%).

Ao analisar apenas os parentes de primeiro grau, foi verificada a prevalência em irmãos com 54 (46%) casos, seguido por 31 pais (26,5%) e 28 mães (24%). Observou-se uma baixa prevalência em filhos (apenas 4 casos, 3,5%).

Em relação à distribuição dos tumores entre parentes de primeiro grau, na figura paterna, o tumor mais prevalente foi em estômago com sete casos (22,5%), enquanto entre as mães, foram útero e mama, cada um com sete casos (25%). Entre irmãos, o mais frequente foi o tumor de mama com 14 casos (24%), seguido de cabeça e pescoço, com 13 casos (22,5%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos tumores entre os parentes de primeiro grau.

Local do tumor	Pai	(%)	Mãe	(%)	Irmãos	(%)	Filhos	(%)
Cabeça e pescoço	5	(16,1)	1	(3,6)	13	(22,4)		
Mama			7	(25,0)	14	(24,1)		
Estômago	7	(22,6)	3	(10,7)	2	(3,4)	1	(25)
Esôfago	2	(6,5)			4	(6,9)		
Cólon	5	(16,1)	4	(14,3)	5	(8,6)		
Próstata	5	(16,1)			2	(3,4)		
Melanoma	1	(3,2)						
Pulmão	2	(6,5)	3	(10,7)	3	(5,2)		
SNC								
Fígado e vias biliares	2	(6,5)			1	(1,7)		
Tireóide			2	(7,1)	1	(1,7)		
Útero			7	(25,0)	7	(12,1)	1	(25)
Pâncreas			1	(3,6)	3	(5,2)		
Pele					1	(1,7)		
Leucemia							1	(25)
Rim					1	(1,7)		
Bexiga	1	(3,2)			1	(1,7)		
Testículo							1	(25)
Abdome*	1	(3,2)						

Legenda: * Tumores abdominais sem especificação; SNC: Sistema Nervoso Central

Analisando a amostra por topografia, foi verificado que o perfil de envolvimento em relação ao parente mais acometido permaneceu inalterado, com os irmãos sempre respondendo à maior parte dos parentes afetados. No entanto, quando analisados os tipos mais prevalentes de tumores nessas famílias, a incidência variou de acordo com a topografía. Em probandos com câncer de cavidade oral, os irmãos eram o familiar mais afetado, sendo os tumores de cabeça e pescoço o mais comum neste grupo (7/18 casos). Por outro lado, em pacientes com câncer de orofaringe, os irmãos permaneceram sendo o grupo mais afetado, mas o câncer de mama foi o tumor mais comumente associado (3/9 casos). Em probandos com câncer de laringe, houve uma predominância significativa dos irmãos como parentes de primeiro grau afetados quando comparados aos pais e mães, respectivamente (22 casos , 9 casos e 7 casos). Neste grupo, observou-se uma maior associação com câncer de mama e tumores de cabeça e pescoço, respectivamente (6 e 5 casos).

Uma análise posterior foi realizada com esta série tentando identificar o perfil de ocorrência quando os grupos foram separados por gênero. Em ambos, homens e mulheres, os parentes de primeiro grau mais afetados em ordem decrescente, foram: irmãos, pais e mães. No entanto, analisando o tipo de tumor relacionado a cada família afetada, observou-se um padrão distinto entre eles. Enquanto no grupo de pacientes do sexo masculino, houve um predomínio de irmãos acometidos por câncer (44 casos), no grupo feminino, os irmãos e os pais foram igualmente afetados (10 casos cada um). Em probandos do sexo masculino, o tumor de cólon foi o mais frequente nos pais, enquanto nas mães foi o tumor de mama. Nos irmãos houve um predomínio de cânceres de mama e carcinoma de cabeça e pescoço (14 e 12,

respectivamente). Em probandos do sexo feminino, o tumor mais comum em pais era estômago, enquanto mães e irmãs tiveram um predomínio de tumores do útero.

Foi também verificado neste grupo de 74 pacientes a presença de famílias com dois ou mais parentes de primeiro grau afetados. A partir disso, avaliou-se o perfil de tumores e parentes mais relacionados com este grupo de pacientes e observou-se que os irmãos permaneciam representando o grupo de parentes mais envolvido (31/67, 46%) e os tumores mais comumente relacionados foram o de mama seguido por cabeça e pescoço.

Foi também realizada uma avaliação exclusiva de um subgrupo de pacientes não tabagistas. Nessa casuística, a mediana de idade foi 60 anos (mínima de 28 anos e máxima de 78 anos). A topografía mais frequente nesses pacientes foi cavidade oral, presente em 54% dos casos. As mães foram os familiares de primeiro grau mais frequentemente acometidas pela doença (60%). Quanto a caracterização dos tumores desses pacientes, 67% pertencia a estágios clínicos mais avançados e 33% a estágios iniciais, na maior parte das vezes à custa da extensão "T" já que 60% eram "N" negativos. Não foi observada diferença quanto ao grau histológico; foi observada uma distribuição semelhante entre os tumores bem diferenciados, pouco diferenciados e moderadamente diferenciados (cerca 33% cada um deles). A maior parte desses pacientes foi submetido a tratamento cirúrgico inicial (74%) e apenas dois deles apresentaram recidivas no seguimento clínico. Os dados referentes a caracterização desses pacientes está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Características epidemiológicas, clínicas e patológicas de pacientes não tabagistas.

ID	Idade	Local	Familiar	EC	Grau	Tratamento	Recidiva
6	63	Cav. Oral	Pai, Filho	IV	Bem dif.	Cirurgia	Não
21	60	Laringe	Mãe, 3 irmãos	IV	Pouco dif.	Qt+ Rxt	Sim
31	69	Laringe	Mãe, Irmão	I	Bem dif.	Rxt	Não
83	74	Cav. Oral	Mãe, Avô	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
23	76	Orofaringe	Pai, 2 irmãos	III	Pouco dif.	Qt + Rxt	Não
28	71	Laringe	Mãe	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
72	78	Cav. Oral	Pai, Mãe	II	Indeterminado	Cirurgia	Não
91	72	Cav. Oral	Mãe	IV	Bem dif.	Cirurgia	Não
127.1	59	Cav. Oral	Irmão	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
129.1	55	Orofaringe	Pai, Mãe, Tio	IV	Pouco dif.	Cirurgia	Não
124.1	50	Orofaringe	Irmão, Primo	II	Mod. dif	Cirurgia	Não
108.1	48	Cav. Oral	Mãe, Tio, Avô	IV	Pouco dif.	Cirurgia	Não
109.1	56	Orofaringe	Pai, Tio	IV	Indeterminado	Qt + Rxt	Sim
135.1	45	Cav. Oral	Mãe, 3 Tios	II	Bem dif.	Cirurgia	Não
103.1	28	Cav. Oral	Primo, Avó	II	Mod. dif.	Cirurgia	Não

Legenda: Pouco dif.: pouco diferenciado; Mod. dif. moderadamente diferenciado; RxT: radioterapia, Qt: quimioterapia, Cav: cavidade; dif. diferenciado

Avaliando um subgrupo de pacientes exclusivamente não etilistas, a mediana de idade foi 59 anos. A topografia mais frequente nesses pacientes foram os tumores de cavidade oral observados em 47% dos casos. O familiar de primeiro grau mais frequentemente acometido foram as mães que apresentaram tumores em 54% desses pacientes. A maioria destes tumores pertencia ao estágios clínicos mais avançados com 74% dos casos com 26% em estágios iniciais. Quanto ao grau, houve predomínio de tumores moderadamente diferenciados (53%). A maior parte desses pacientes foi submetido a tratamento cirúrgico inicial (74%) e nenhum deles

apresentou recidiva no seguimento clínico. Os dados referentes a caracterização desses pacientes está abaixo na Tabela 5.

Tabela 5 - Características epidemiológicas, clínicas e patológicas de pacientes não etilistas.

ID	Id ad e	Local	Familiar	EC	Grau	Tratament 0	Recidiva
6	63	Cav. Oral	Pai, Filho	IV	Bem dif.	Cirurgia	Não
31	69	Laringe	Mãe, Irmão	I	Bem dif.	Rxt	Não
34	58	Laringe	Pai	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
53	59	Hipofaringe	Irmão	IV	Mod. dif.	Qt+Rxt	Não
83	74	Cav. Oral	Mãe, Avô	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
39	53	Orofaringe	Pai	IV	Pouco dif.	Qt+Rxt	Não
3	63	Laringe	Pai	III	Mod. dif.	Qt+Rxt	Não
28	71	Laringe	Mãe	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
72	78	Cav. Oral	Pai, Mãe	II	Indeterminado	Cirurgia	Não
91	72	Cav. Oral	Mãe	IV	Bem dif.	Cirurgia	Não
127.1	59	Cav. Oral	Irmão	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
130.1	57	Laringe	Mãe, Irmão, 2 Avós	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
124.1	50	Orofaringe	Irmão, Primo	II	Mod. dif.	Cirurgia	Não
108.1	48	Cav. Oral	Mãe, Tio, Avô	IV	Pouco dif.	Cirurgia	Não
135.1	45	Cav. Oral	Mãe, 3 Tios	II	Bem dif.	Cirurgia	Não

Legenda: Pouco dif.: pouco diferenciado; Mod. dif. moderadamente diferenciado; RxT: radioterapia, Qt: quimioterapia; Cav: cavidade; Dif. diferenciado

Na análise dos pacientes não etilistas e não tabagistas, e que obviamente eram comuns aos grupos anteriormente citados, a média de idade foi 63 anos (mínima de 28 anos e máxima de 78 anos). A topografía mais frequente nesses pacientes foram os tumores de cavidade oral com 70% da amostra. As mães apresentaram tumores em 70% desses casos, representando o grupo familiar mais acometido. Quanto a

caracterização dos tumores desses pacientes, a maior parte pertencia a estágios clínicos mais avançados com 60% dos casos. Quanto ao grau, não ocorreu nenhuma tendência com distribuição semelhante entre bem diferenciados e moderadamente diferenciados. A maior parte desses pacientes foi submetido a tratamento cirúrgico inicial (90%) e nenhum deles apresentou recidiva no seguimento clínico. Os dados referentes a caracterização desses pacientes está abaixo na Tabela 6.

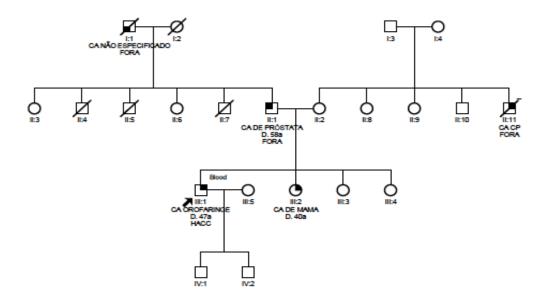
Tabela 6 - Características epidemiológicas, clínicas e patológicas de pacientes não etilistas e não tabagistas.

						Tratament	Recidiv
ID	Idade	Local	Familiar	EC	Grau	0	a
6	63	Cav. Oral	Pai, Filho	IV	Bem dif.	Cirurgia	Não
31	69	Laringe	Mãe, Irmão	I	Bem dif.	Rxt	Não
83	74	Cav. Oral	Mãe, Avô	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
28	71	Laringe	Mãe	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
72	78	Cav. Oral	Pai, Mãe	II	Indeterminado	Cirurgia	Não
91	72	Cav. Oral	Mãe	IV	Bem dif.	Cirurgia	Não
127.1	59	Cav. Oral	Irmão	IV	Mod. dif.	Cirurgia	Não
124.1	50	Orofaringe	Irmão, Primo	II	Mod. dif.	Cirurgia	Não
108.1	48	Cav. Oral	Mãe, Tio, Avô	IV	P. dif.	Cirurgia	Não
135.1	45	Cav. Oral	Mãe, 3 Tios	II	Bem dif.	Cirurgia	Não

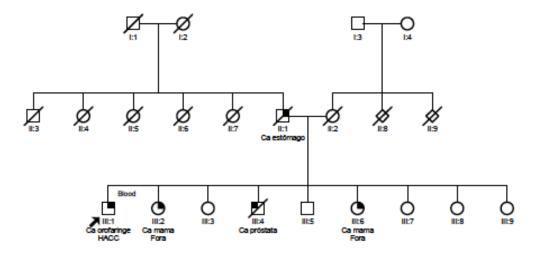
Legenda: Pouco dif.: pouco diferenciado; Mod. dif: moderadamente diferenciado; RxT: radioterapia,; Cav: cavidade; Dif: diferenciado.

A seguir estão apresentadas 12 famílias selecionadas para a avaliação de expressão dos miRNAs (Figura 2). Entre estas famílias, foram também incluídos seis parentes com a doença que aceitaram participar do estudo.

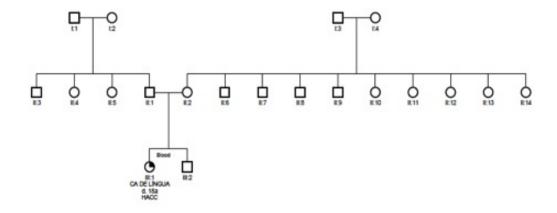
CASO 55.1- Probando assinalado por seta (III:1). A irmã portadora de câncer de mama (III:2) foi incluída no estudo.



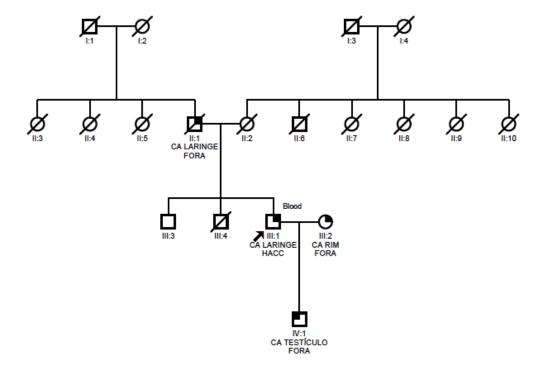
CASO 23.1 - Probando assinalado por seta (III:1). A irmã portadora com câncer de mama (III:2) foi incluída no estudo.



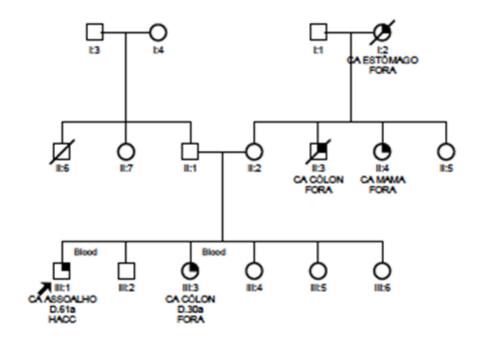
CASO 112.1 - Probando assinalado por seta (III:1).



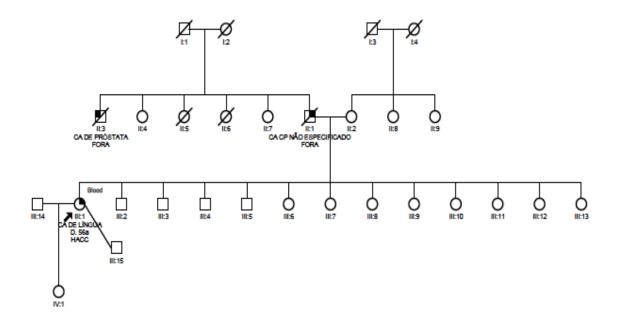
CASO 52.1 Probando assinalado por seta (III:1). O filho portador de câncer de testículo (IV:1) foi incluído no estudo.



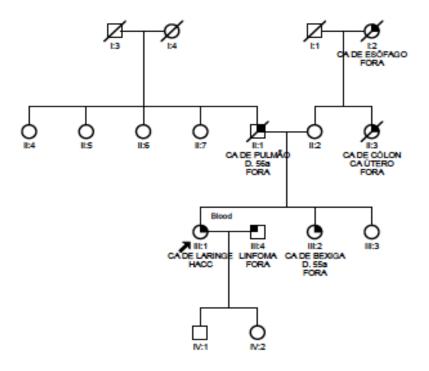
CASO 120.1 - Probando assinalado por seta (III:1). A irmã portadora de câncer de cólon (III:3) foi incluída no estudo.



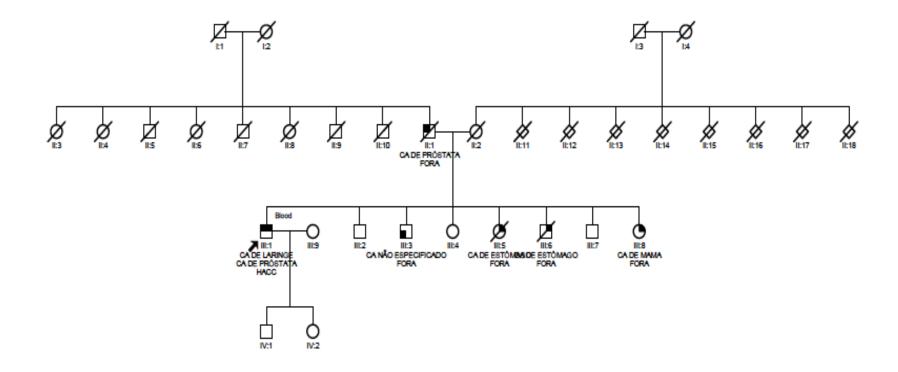
CASO 109.1 - Probando assinalado por seta (III:1).



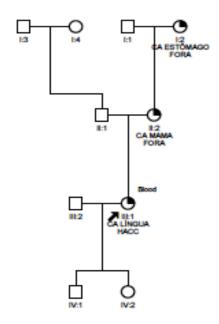
CASO 7.1 - Probando assinalado por seta (III:1). A irmã portadora de câncer de bexiga (III:2) foi incluída no estudo.



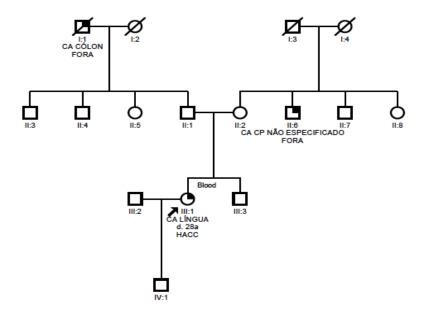
CASO 10.1 - Probando assinalado por seta (III:1). A irmã portadora de câncer de mama (III:8) foi incluída no estudo.



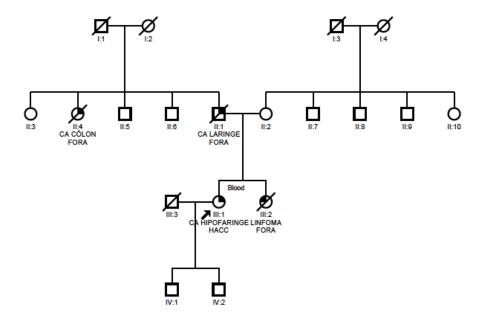
CASO 90.1 - Probando assinalado por seta (III:1).



CASO 103.1 - Probando assinalado por seta (III:1).



CASO 65.1 - Probando assinalado por seta (III:1).



CASO 39.1 - Probando assinalado por seta (III:1).

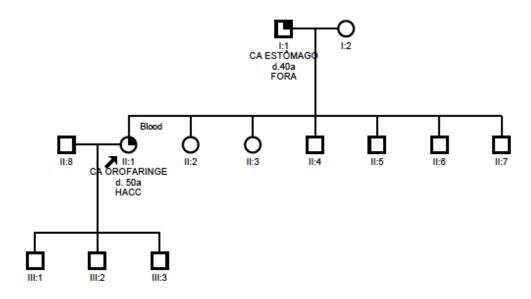


Figura 2 - Heredogramas das 12 famílias selecionadas para a análise de expressão global dos miRNAs. Os probandos estão indicados por setas. Os parentes incluídos no estudo são os referentes aos pacientes: 7.1, 10.1, 23.1, 52.1, 55.1, 120.1.

4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs

Doze probandos e seis parentes afetados por câncer foram incluídos segundo os critérios adotados e analisados para a expressão de miRNAs. Após a aplicação dos filtros foram identificados 283 miRNAs diferencialmente expressos. Na análise pareada, observando apenas miRNAs com o mesmo padrão de expressão (aumentado ou diminuído) em pelo menos um dos seis pares [escore A ≥ (1)], a lista de miRNAs foi reduzida para 65 miRNAs (Figura 3). Os casos não pareados com os respectivos familiares foram utilizados para o cálculo do escore B (Quadro 1). Os números estipulados na Quadro 1 equivalem aos pares de probando e respectivos parentes no Escore A e apenas probandos no Escore B (Ex: par 23 → probando número 23 e respectivo parente; 103.1 → probando número 103.1) onde os números representam a identidade de cada probando captado no estudo. Os dados com os valores numéricos de expressão encontram-se disponíveis no quadro suplementar 1 (Anexo 1).

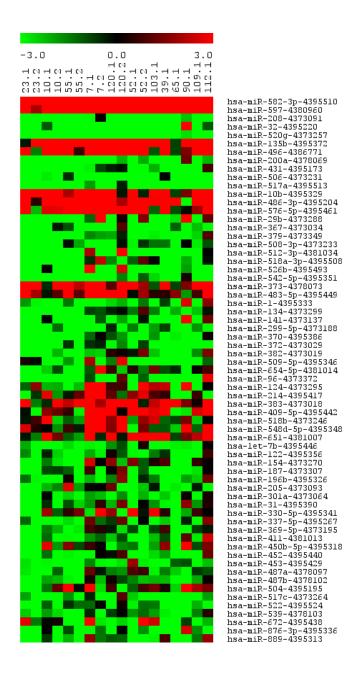


Figura 3 - *Heatmap* ilustrando a expressão dos 65 miRNAs diferencialmente expressos que apresentavam escore **A** maior ou igual a |1| entre todas as amostras avaliadas. Verde = expressão inferior à referência; Vermelho = expressão superior à referência.

Quadro 1 - Sessenta e cinco miRNAs com escore igual ou superior a |1| para seis pares de pacientes (paciente e familiar com câncer).

miRNA	par 7	par 10	par 23	par 52	par 55	par 120	Escore A	39.1	65.1	90.1	103.1	109.1	112.1	Escore B
hsa-miR-582*	+	+	+	+	+	+	+6	+	+	+	+	+	+	+6
hsa-miR-597*	+	+		+	+	+	+5	+	+	+	+	+	+	+6
hsa-miR-135b*	+	+			+	+	+4	+		+	+	+	+	+5
hsa-miR-496*	+	+		+		+	+4	+				+	+	+3
hsa-miR-10b	+	+	+				+3	+			+	+	+	+4
hsa-miR-486	+	+		+			+3	+	+	-		+	+	+3
hsa-miR-576	+			+		+	+3	+					+	+2
hsa-miR-373	+		+				+2					+	+	+2
hsa-miR-483	+					+	+2						+	+1
hsa-miR-124	+						+1			+		-		0
hsa-miR-214	+						+1		-	-			-	-3
hsa-miR-383						+	+1	+	+				+	+3
hsa-miR-409	+						+1	+	-				+	+1
hsa-miR-518b	+						+1							0
hsa-miR-548d	+						+1			+			+	+2
hsa-miR-651				+			+1	+			+		+	+3
hsa-let-7b		-					-1	-			-	-		-3

miRNA	par 7	par 10	par 23	par 52	par 55	par 120	Escore A	39.1	65.1	90.1	103.1	109.1	112.1	Escore B
hsa-miR-122					-		-1		-	-		-		-3
hsa-miR-154					-		-1		-	-				-2
hsa-miR-187			-				-1	-	-	-	-			-4
hsa-miR-196b		-					-1	-	-					-2
hsa-miR-205			-				-1	-		-			-	-3
hsa-miR-301a			-				-1		-		-	-		-3
hsa-miR-31			-				-1		-					-1
hsa-miR-330			-				-1		-					-1
hsa-miR-337		-					-1		-		-	-		-3
hsa-miR-369			-				-1		-	-				-2
hsa-miR-411				-			-1		-					-1
hsa-miR-450b			-				-1		-	+				0
hsa-miR-452				-			-1		-	-		-		-3
hsa-miR-453					-		-1	-			-	-		-3
hsa-miR-487a					-		-1			-				-1
hsa-miR-487b			-				-1			-				-1
hsa-miR-504			-				-1			+				+1

miRNA	par 7	par 10	par 23	par 52	par 55	par 120	Escore A	39.1	65.1	90.1	103.1	109.1	112.1	Escore B
hsa-miR-517c		-					-1	-	-	-	-	-		-5
hsa-miR-522			-				-1	-	-	-			-	-4
hsa-miR-539					-		-1			-				-1
hsa-miR-672					-		-1	-				-		-2
hsa-miR-876			-				-1	-	-		-		-	-4
hsa-miR-889				-			-1		-	-				-2
hsa-miR-1	-	-					-2		-		-	-		-3
hsa-miR-134			-		-		-2	-		-				-2
hsa-miR-141			-		-		-2	-	-	+	-	-		-3
hsa-miR-299			-		-		-2		-	-			-	-3
hsa-miR-370			-		-		-2	-		-		-		-3
hsa-miR-372		-	-				-2	-	-	-	-	-	-	-6
hsa-miR-382			-		-		-2	-	-	-				-3
hsa-miR-509		-		-			-2	-	-	-	-	-		-5
hsa-miR-654			-		-		-2			-				-1
hsa-miR-96		-	-				-2	-	-	-	-	-		-5
hsa-miR-29b		-	-		-		-3	-		+	-	-		-2

miRNA	par 7	par 10	par 23	par 52	par 55	par 120	Escore A	39.1	65.1	90.1	103.1	109.1	112.1	Escore B
hsa-miR-367	-		-	-			-3	-		-	-		-	-4
hsa-miR-379		-	-	-			-3	-	-					-2
hsa-miR-508	-	-	-				-3		-					-1
hsa-miR-512		-		-	-		-3	-	-		-	-		-4
hsa-miR-518a		-	-		-		-3	-	-			-		-3
hsa-miR-526b			-	-	-		-3	-	-		-	-		-4
hsa-miR-542	-	-			-		-3	-	-			-	-	-4
hsa-miR-200a	-	-	-		-		-4	-	-		-	-		-4
hsa-miR-431*		-	-	-	-		-4	-	-	-		-		-4
hsa-miR-506	-		-	-		-	-4		-	-	-	-	-	-5
hsa-miR-517a*		-	-	-	-		-4	-	-	-	-	-	-	-6
hsa-miR-208		-	-	-	-	-	-5	-	-		-	-	-	-5
hsa-miR-32	-		-	-	-	-	-5	-	-			-		-3
hsa-miR-520g		-	-	-	-	-	-5	-	-		-	-	-	-5

Demarcados em cinza) (escore A) e avaliação para os casos não-pareados (escore B).

O Quadro 2 apresenta os miRNAs selecionados por apresentarem os maiores escores e os genes que eles regulam em diferentes tipos de tumores. Os genes candidatos a regulação dos miRNAs selecionados foram obtidos do banco de dados www.microrna.org/ferrolab.dmi.unict.it/miro.

Quadro 2 - Avaliação *in silico* de alguns miRNAs com score elevado, os genes potencialmente regulados e as neoplasias em que estas alterações foram descritas. Bancos de dados utilizados: www.microrna.org/ferrolab.dmi.unict.it/miro

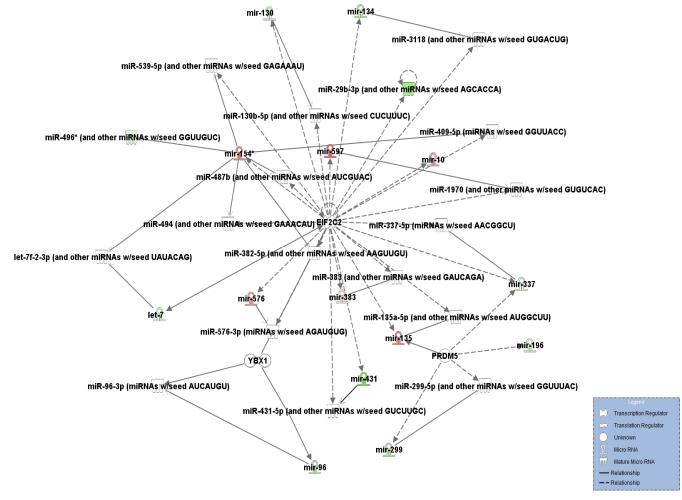
miRNA	Genes regulados	Neoplasias relacionadas						
hsa-miR-582-3p	PTEN	endométrio, colorretal, SNC, mama, pulmão, cabeça e						
		pescoço e esôfago						
hsa-miR-597	IL10	estômago, nasofaringe, rim, mama, melanoma						
	CDH1	próstata, mama, estomago, colorretal, câncer urotelial, bexiga,						
		esôfago						
	EGFR	cavidade oral, cabeça e pescoço, mama, estomago, esôfago,						
		astrocitoma, pâncreas, colorretal, pulmão,						
	FGFR4	cabeça e pescoço, melanoma, pulmão, colorretal						
	HRAS	cavidade oral, pulmão, tireóide, útero, mama, cólon						
	TIMP2	cabeça e pescoço, mama, estomago						
	TNF	câncer oral						
	TGFBR1	bexiga, cólon e mama						
hsa-miR-135b	IRS2	mama e colorretal						
	BACH1	mama						
	HIF1A	útero, ovário, esôfago						
	PTK2	hepatocarcinoma						
hsa-miR-496	RAG1	bexiga						
	RS2	bexiga						
	TGFBR1	bexiga ,mama, colorretal						
	NCOA3	mama						
	CALCR	mama						
	CDK7	mama						
	RECK	mama						
	TOX	mama						
	CENPE	mama						
hsa-miR-431	TGFBR1	bexiga, cólon e mama						
	ITGA3	mama						
	CALCR	mama						
	IRS2	mama e colorretal						
hsa-miR-517a	IGF1	mama, cólon						
	PTPRT	leucemia, figado, mama, colorretal, estomago, pulmão						
	HFE	hepatocarcinoma, colorretal, pele						
	IGF2	câncer oral						
	IL1a	bexiga, linfoma, vulva e estômago						
	LPL	colorretal						
	SLC11A1	esôfago						
	VDR	mama e colorretal						

miRNA	Genes regulados	Neoplasias relacionadas
hsa-miR-10b	BCL6	linfoma
	BTRC	estômago
	ACVR2A	cólon
	AKAP10	mama
	AREHEF11	pulmão
	CALCR	mama
	CAMKK1	pulmão
	CYP11B2	mama
	FASLG	ovário, mama, útero, pulmão esôfago, tireóide, colorretal, bexiga e melanoma
	HLA DPB1	linfoma, carcinoma hepatocelular, nasofaringe, mama, útero
	HLAE	nasofaringe
	LTBP1	ovário
	PIK3CA	estômago, tireóide, colorretal, mama, esôfago, pulmão
	PTEN	endométrio, colorretal, SNC, mama, pulmão, cabeça e
		pescoço e esôfago
	TGFBR1	bexiga, cólon e mama
hsa-miR-486-3p	HLADRB1	cabeça e pescoço, inúmeros tumores
	IGF1	cavidade oral
	IGF2	cavidade oral
	MMP2	cabeça e pescoço
	TNF	cavidade oral
	VEGFA	cavidade oral
hsa-miR-508-3p	ACVR2A	colorretal
	ERBB4	pulmão
	NFKB1	colorretal e melanoma
	PIGR	nasofaringe
	PTGS2	SNC, estômago, colorretal, pele, mama, pulmão, esôfago
	RAD23B	bexiga, mama e pulmão
	RRM2B	colorretal e pulmão
	SMAD4	colorretal
	ABCC1	leucemia, SNC, pulmão
	ABCG2	mama, esôfago
	ARL11	colorretal, mama, leucemia, melanoma
	CDH1	próstata, mama, estomago, esôfago, bexiga
	FASLG	ovário, mama, útero, pulmão, esôfago, tireoide, colorretal, bexiga, melanoma, meningeoma
	GSTM3	cavidade oral, câncer de cabeça e pescoço, bexiga, pele, linfoma, estômago, laringe, mama, rim
	KRAS	pulmão, pâncreas, endométrio, colorretal
	MMP7	pulmão, estomago, SNC, ovário, esôfago
	TP53	leucemia, endométrio, cavidade oral , pele, melanoma, útero, sarcoma de kaposi, ovário, cabeça e pescoço , cólon,
	VIII	mama, tireoide, sarcoma, pâncreas
	VHL VBCC2	rim, mama, colorretal, SNC
	XRCC2	mama, pâncreas, pulmão, leucemia, pele, bexiga
	HIF1A	rim, esôfago, colorretal, próstata

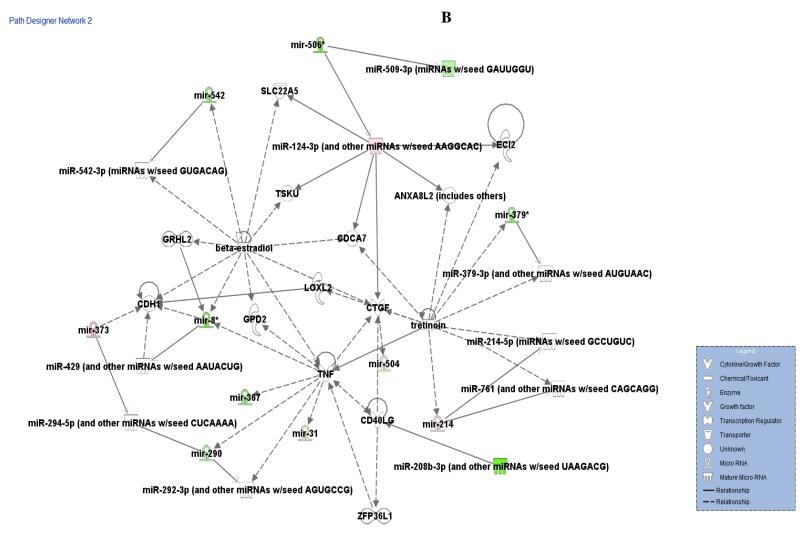
miRNA	Genes regulados	Neoplasias relacionadas
hsa-miR-542-5p	TGFBR1	bexiga, cólon e mama
	RPA1	cabeça e pescoço e pulmão
	VEGFA	cavidade oral
hsa-miR-520g	VEGFA	cavidade oral
O	FLT3	leucemia
hsa-miR-506	CEBPA	leucemia
	BCL6	endométrio
	AR	cabeça e pescoço, colorretal, próstata, mama e endométrio
	CALCA	ovário
	CAVI	colorretal e próstata
	CLOCK	esôfago
	JA4	pulmão
	HLA DPB1	hepatocarcinoma, linfoma, nasofaringe, mama, leucemia, útero
	IRF1	útero
	ITB3	mama, próstata, rim e ovário
	MDK	colorretal
	MYLK2	mama, colorretal, estômago e pulmão
	NR3C1	melanoma
	NRAS	melanoma e leucemia
	RAD23B	pulmão, mama e bexiga
	RASSF1	cabeça e pescoço, esôfago, pulmão, bexiga, reto e mama
	RNASEL	pâncreas
	SLC40A1	mama
	TRFC	mama, hepatocarcinoma, colorretal
	TFBR1	bexiga, colorretal, mama, rim e ovário
h iD . 57.6 . 5	TNF	cabeça e pescoço
hsa-miR-576-5p	CDKN1A	cavidade oral
	IGF1	cavidade oral cavidade oral
	IGF2 PIK3CA	estômago, tireóide, colorretal, mama, esôfago, pulmão
	RB1	retinoblastoma, colorretal, pulmão
	TGFBR1	bexiga, cólon e mama
	VEGFA	cavidade oral
	BRCA1	mama
	CDH1	próstata, mama, estômago, esôfago, bexiga
	CDKN2A	cabeça e pescoço
	CYP3A4	cavidade oral
	ITGB3	ovário, pâncreas, colorretal, mama
	MMP2	cabeça e pescoço
	MYC	cavidade oral
	OGG1	cavidade oral
	TNF	cabeça e pescoço
	XPC	cabeça e pescoço
	XRCC2	laringe
	BCL2	laringe

miRNA	Genes regulados	Neoplasias relacionadas
hsa-miR-29b	MMP2	cabeça e pescoço
	PTEN	Próstata, colorretal, mama, cabeça e pescoço, rim, ovário
	BCL2	laringe
	GSTM3	cavidade oral
	VEGFA	cavidade oral
	RET	tireóide, pulmão, bexiga

Foram identificadas três principais redes gênicas geradas pelo software IPA (avaliando os 65 miRNA com escore >|1|), a primeira relacionada a doenças genéticas, musculares e esqueléticas e doenças do sistema reprodutivo, a segunda relacionada a câncer, desenvolvimento celular e morfologia tumoral e a terceira a câncer, doenças do sistema endócrino e do sistema reprodutivo (Figuras 4, 5 e 6). Foram incluídas somente as interações diretas e indiretas entre as moléculas, já descritas experimentalmente. Vários bancos de dados foram utilizados pelo software IPA para geração de redes gênicas, dentre eles os bancos Targetscan, mirBase e miRrecords.



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

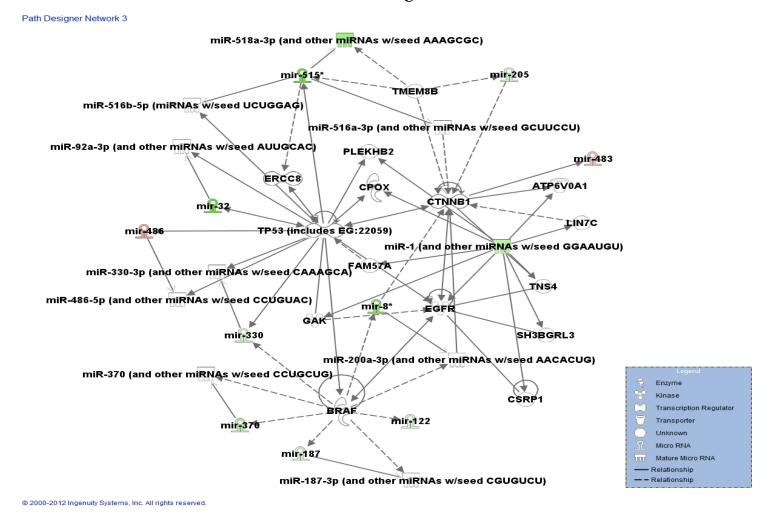


Figura 4 - As três principais redes gênicas detectadas relacionando os miRNAs (A-C). Os símbolos em vermelho indicam os miRNA mais expressos nos pacientes com câncer e em verde os genes com menor expressão. As linhas em preto indicam a interação direta entre os genes enquanto as linhas pontilhadas inferem uma relação indireta.

O Quadro 3 apresenta os escores obtidos para cada miRNA detectado como diferencialmente expresso assim como as redes a eles relacionadas (redes 1, 2 e 3) e se eventualmente já foi relacionado a alguma síndrome hereditária.

Quadro 3 - Tabela relacionando os escores encontrados para os miRNAs com suas vias e potenciais relações com síndromes hereditárias.

miRNA	Escore	Síndrome Hereditária	Network 1	Network 2	Network 3
hsa-miR-582	6				
hsa-miR-597	5		X		
hsa-miR-208	-5			X	
hsa-miR-32	-5				X
hsa-miR-520g	-5				
hsa-miR-135b	4		X		
hsa-miR-496	4		X		
hsa-miR-200a	-4				
hsa-miR-431	-4		X		
hsa-miR-506	-4			X	
hsa-miR-517a	-4				
hsa-miR-10b	3		X		
hsa-miR-486	3	X			X
hsa-miR-576	3		X		
hsa-miR-29b	-3	X	х		
hsa-miR-367	-3				
hsa-miR-379	-3	X		X	
hsa-miR-508	-3				
hsa-miR-512	-3				
hsa-miR-518a	-3				
hsa-miR-526b	-3				
hsa-miR-542	-3			X	
hsa-miR-373	2		X		
hsa-miR-483	2				X
hsa-miR-1	-2				Х
hsa-miR-134	-2		х		
hsa-miR-141	-2				
hsa-miR-299	-2		X		

Cont/ Quadro 3

miRNA	Escore	Síndrome Hereditária	Network 1	Network 2	Network 3
hsa-miR-370	-2				X
hsa-miR-372	-2				
hsa-miR-382	-2				
hsa-miR-509	-2			X	
hsa-miR-654	-2				
hsa-miR-96	-2	X	Х		
hsa-miR-124	1			X	
hsa-miR-214	1	X			
hsa-miR-383	1		х		
hsa-miR-409	1				
hsa-miR-518b	1				
hsa-miR-548d	1				
hsa-miR-651	1				
hsa-let-7b	-1	X	Х		
hsa-miR-122	-1				X
hsa-miR-154	-1	X	Х		
hsa-miR-187	-1				X
hsa-miR-196b	-1		х		
hsa-miR-205	-1				X
hsa-miR-301a	-1				
hsa-miR-31	-1				
hsa-miR-330	-1				X
hsa-miR-337	-1		х		
hsa-miR-369	-1				
hsa-miR-411	-1				
hsa-miR-450b	-1				
hsa-miR-452	-1	X			
hsa-miR-453	-1				
hsa-miR-487a	-1				
hsa-miR-487b	-1				
hsa-miR-504	-1			X	
hsa-miR-517c	-1				
hsa-miR-522	-1				
hsa-miR-539	-1				
hsa-miR-672	-1				
hsa-miR-876	-1				
hsa-miR-889	-1				

4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE MicroRNAS (miRNA)

Seis miRNAs (hsa-miR-597, hsa-miR-496, hsa-miR-517a, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-135b e hsa-miR-431) foram selecionados para serem confirmados por ensaios individuais (Applied Biosystems) de RT-qPCR (Quadro 4).

Quadro 4 - Descrição dos miRNAs e ensaios selecionados para análise de expressão por RT-qPCR.

MicroRNAs	Código do ensaio (ABI)	Sequência miRNA maduro	
hsa-miR-582-3p	002399	UAACUGGUUGAACAACUGAACC	
hsa-miR-597	hsa-miR-597 001551 UGUGUCACU		
hsa-miR-135b-5p	002261	UAUGGCUUUUCAUUCCUAUGUGA	
hsa-miR-496	001953	UGAGUAUUACAUGGCCAAUCUC	
hsa-miR-431-5p	001979	UGUCUUGCAGGCCGUCAUGCA	
hsa-miR-517a-3p	002402	AUCGUGCAUCCCUUUAGAGUGU	

4.4 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DO TLDA

A etapa de confirmação foi dividida em duas fases. A primeira fase é a de confirmação dos resultados, já que os ensaios TLDA não possuíam duplicatas. Nesta fase, foram selecionados somente os pares previamente analisados. Foi utilizado o mesmo desenho experimental que os ensaios TLDA (pool + amostras de pacientes e parentes), exceto pela exclusão do par 23, pois não havia mais material da amostra 23.2. O limiar foi reduzido para cinco vezes mais ou menos a expressão em relação ao pool, pois o limiar alto (10 vezes) foi estabelecido apenas para a filtragem de miRNAs de interesse durante a triagem por TLDA. Esta fase de confirmação foi

concluída e dois miRNA apresentaram alto score (similar aos da plataforma TLDA). Outros dois miRNAs apresentaram escores mais baixos, porém na mesma direção da plataforma e dois miRNA não apresentaram correlação com a plataforma TLDA. Os resultados dos escores, tanto para os ensaios individuais, quanto para os ensaios TLDA estão representados no Quadro 5. Os dados com os valores numéricos de expressão encontram-se disponíveis no quadro suplementar 1. Os dados com os valores numéricos de expressão do ensaio individual encontram-se disponíveis no quadro suplementar 2. (Anexo 1)

Quadro 5 - Seis miRNAs selecionados para a confirmação para cinco pares de pacientes previamente avaliados (paciente e familiar com câncer) (escore A).

miRNA	Técnica	par 10	par 55	par 7	par 120	par 52	escore A
hsa-miR-597*	TLDA	+	+	+	+	+	+5
	Ensaio individual	+	+	+	+	+	+5
hsa-miR-496*	TLDA	+		+	+	+	+4
	Ensaio individual	+	+		+	+	+4
hsa-miR-517a	TLDA	-	-			-	-3
	Ensaio individual	-					-1
hsa-miR-135b	TLDA	+	+	+	+	+	+5
	Ensaio individual	+					+1
hsa-miR-431	TLDA	-	-			-	-3
	Ensaio individual						0
hsa-miR-582-3p	TLDA	+	+	+	+	+	+5
-	Ensaio individual						0

Legenda: (+) aumento de expressão em relação ao pool (em ambos os pacientes relacionados para o cálculo do escore A); (-) redução de expressão em relação ao pool (em ambos os pacientes relacionados para o cálculo do escore A).

Como foi observada a relação entre o hsa-miR-597 com genes previamente descritos em literatura como envolvidos em carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo *EGFR*, *RAS e TNF*, foram avaliadas as vias moleculares relacionadas a tais genes, as quais estão apresentadas nos Anexos 2 a 4.

5 DISCUSSÃO

É admitido que 5 a 10% de todos os cânceres são hereditários ou familiais (GARBER e OFFIT 2005). Identificar famílias com predisposição ao câncer hereditário é importante, uma vez que seus membros têm um alto risco de desenvolver tumores. A identificação e o acompanhamento adequado desses indivíduos são cruciais para o diagnóstico precoce do câncer, aumentando as chances de sobrevivência em longo prazo. Além disso, a compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de tumores hereditários também permite aumentar o conhecimento sobre a genética do câncer (SANTOS et al. 2007).

A presença de um componente genético envolvido na predisposição ao câncer familial é evidenciado pela ocorrência de agregação de determinados tipos de tumores em certas famílias. Embora vários estudos descrevam a história familiar como um possível fator de risco em tumores de cabeça e pescoço, os resultados descritos até o presente são limitados. O papel dos fatores hereditários em tumores de cabeça e pescoço foi sugerido com base em relatos de caso (HARA et al. 1988; TASHIRO et al. 1986). Um conjunto de informações subsequentes, provenientes de estudos caso-controle, deram subsídios adicionais para esta associação inicial (COPPER et al. 1995; FOULKES et al. 1995; 1996; GARAVELLO et al. 2008). Vários estudos têm mostrado uma proporção significativa dos casos de câncer em famílias de pacientes com CECP, com um risco aumentado de desenvolver esses tumores comparados aos controles sem história familiar.

O presente estudo utilizou uma seleção criteriosa de pacientes portadores de

CECP que apresentavam casos de câncer na família. A dificuldade inicial foi estabelecer critérios de uma suposta síndrome familial, uma vez que não existe em literatura nenhuma descrição similar. Foram selecionados pacientes que apresentavam obrigatoriamente um parente de primeiro grau acometido por câncer. NEGRI et al. (2009) descreveram em um grande estudo epidemiológico, a ocorrência de tipos de tumores relacionados aos tumores de cabeça e pescoço incluindo carcinomas de pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, figado, rim, bexiga, cólon, útero e medula óssea. Em adição, outros estudos evidenciaram uma associação entre mutações no gene TP16 em famílias que apresentavam tumores de cabeça e pescoço (YU et al. 2002). Essa relação é fortemente sugerida pela função deste gene supressor tumoral com o ciclo celular. Outros estudos caso-controle têm dado evidências adicionais que os fatores etiológicos conhecidos associados ao câncer de cabeça e pescoço não explicam adequadamente uma parcela significativa destes tumores. Em conjunto, estes dados sugerem uma nova entidade clínica, o CECP familial. Os critérios clínicos utilizados foram adaptados aos reconhecidamente aplicados em síndromes conhecidas, como a Síndrome de Lynch, em câncer colorretal hereditário. Os achados do presente estudo dão evidências adicionais que merecem ser consideradas na conduta destes pacientes evidenciando que a história familiar em pacientes com CECP não pode ser negligenciada e merece especial atenção.

O primeiro ponto a ser discutido é a seleção de pacientes. A grande dificuldade do estudo foi obter amostras de pacientes com parentes vivos acometidos por câncer, uma vez que a maioria já tinha ido a óbito pela doença. Tanto os tumores de cabeça e pescoço quanto aqueles definidos como relacionados, por serem

geralmente diagnosticados em estádios clínicos avançados, apresentam uma alta taxa de mortalidade. Outro ponto a ser discutido é a comprovação da topografia do tumor do parente também acometido por câncer, já que grande parte não possuía os atestados de óbitos ou resultados de exames anátomo patológicos. MURFF et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar a precisão da informação coletada sobre a presença de história familiar. Foram coletados dados sobre história familiar para tumores de mama, cólon, próstata, ovário e endométrio no período de 1966 até 2004. A conclusão do estudo foi de que a coleta de dados principalmente no que concerne a parentes de primeiro grau é precisa, na maior parte dos casos, principalmente para tumores de cólon e mama. Partindo do pressuposto de que os tumores de cabeça e pescoço são estigmatizantes e que dificilmente são esquecidos pelo paciente ou parente, uma vez que todas as nuances da doença e do tratamento são extremamente marcantes do ponto de vista social, acredita-se que as informações coletadas, mesmo que sem comprovação histopatológica, devem ser valorizadas e são precisas.

Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico para a avaliação do padrão de expressão de um grande número de microRNAs baseado na hipótese que alterações constitutivas nestes miRNAs teriam potencial para contribuir para uma síndrome de câncer hereditário. Vários relatos em literatura têm utilizado um racional semelhante em amostras de sangue periférico para avaliar alterações moleculares em estudos familiais (LIU et al. 2010; YANG et al. 2010; CATUCCI et al. 2010; SHEN et al. 2012).

Um questionamento no uso de amostras obtidas de sangue periférico para avaliar miRNAs é a qualidade e a estabilidade do mRNA obtido com relação ao armazenamento das amostras. MRAZ et al. (2009) realizaram a análise de 29

miRNAs a partir de amostras de RNA obtidas de sangue periférico recém coletadas, e outra após 14 dias de armazenamento a -80°C. A análise dessas amostras foi realizada durante um período de aproximadamente 10 meses de armazenamento. O grupo observou uma alta estabilidade de miRNAs e seus respectivos cDNAs concluindo que as amostras de miRNA obtidas não mostraram qualquer tendência de degradação, quando devidamente armazenadas e manipuladas. Mesmo com estes dados em literatura, a coleta de sangue periférico da casuística do presente estudo foi realizada em tubos específicos (Paxgen Blood RNA – Qiagen) destinado à coleta, armazenamento e transporte de sangue periférico imediatamente após a coleta das amostras. Estes frascos permitem a estabilização e a conservação do RNA intracelular em um sistema fechado para subsequente isolamento e purificação do RNA intracelular para quaisquer aplicações, dentre as quais a análise e quantificação da expressão gênica. Isso viabiliza e torna acurada a utilização de técnicas como a PCR quantitativa em tempo real utilizada no presente estudo.

Outro questionamento quanto a utilização de amostras de sangue diz respeito à alteração dos níveis de expressão de miRNAs por outros fatores que não sejam a hereditariedade. De fato, existem estudos relatando a utilização de miRNAs na detecção precoce de algumas neoplasias, como mama e estômago (CUK et al. 2012; SONG et al. 2012). Outros estudos referem a possível correlação destas moléculas com a presença de doença metastática (MADHAVAN et al. 2012). Em suma, as duas correntes defendem que a presença da atividade tumoral de forma independente poderia afetar a expressão de miRNAs, o que de fato é uma hipótese razoável. Avaliando o presente estudo, perecebe-se que apenas 4 casos (120.1; 109.1; 52.1 e 103.1) apresentavam doença em atividade (ainda estavam com o tumor) quando

ocorreu a coleta da amostra de sangue. Dado ainda mais relevante é que nenhum dos familiares apresentava-se com doença em atividade. Pensando-se na eventualidade de metástases ocultas e células tumorais circulantes, apenas três casos (120.1; 109.1; 52,1) dos 12 avaliados apresentaram recidiva (dois casos utilizados no ESCORE A e um no ESCORE B). A estratégia desse estudo baseou-se em parear probando e familiar acometido por câncer e o escore A foi positivo ou negativo apenas quando tanto probando quanto familiar apresentassem aumento ou diminuição de expressão de um determinado miRNA. Tendo em vista que nenhum dos parentes apresentava doença em atividade, podemos formular a hipótese de que aqueles microRNAs que apresentaram-se como ESCORE A positivo ou negativo, são de fato, fortes candidatos a serem moléculas de predisposição.

As síndromes de cânceres hereditários associadas com mutações germinativas, envolvendo genes de alta penetrância, podem predispor um grande número de indivíduos ao desenvolvimento de tumores em uma família. No entanto, apenas 5 a 10% dos cânceres humanos estão associados a essas mutações. Mais de 200 síndromes de cânceres hereditários foram descritas, a maioria com herança autossômica dominante (HARA et al. 1988; TUCKER e FRIEDMAN 2002). Embora raras, elas representam uma proporção substancial de morbidade e mortalidade na população humana (TASHIRO et al. 1986; HARA et al. 1988).

A partir de um estudo caso-controle conduzido nos EUA, GOLDSTEIN et al. (1994) observaram que o risco para indivíduos com história familiar positiva de câncer foi de 1,4 maior para câncer oral e de 2,3 vezes maior para o câncer da faringe entre os pais e irmãos. FOULKES et al. (1995) demonstraram uma forte associação entre aumento do risco de câncer de cabeça e pescoço entre os familiares de

pacientes com este tipo de câncer. O risco foi de 1,97 vezes maior entre parentes de primeiro grau com qualquer tipo de câncer, aumentando para 3,65 vezes se o parente teve câncer de cabeça e pescoço. Neste estudo, o risco aumentou significativamente quando havia irmãos e pais com CECP. COPPER et al. (1995) estimou o risco relativo de 3,5 para CECP quando parentes de primeiro grau apresentavam câncer de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão. No entanto, este risco aumentava para 14,6, quando se considerava somente os irmãos. Acredita-se que fatores ambientais compartilhados entre os indivíduos de uma mesma família não seriam suficientes para explicar esses dados, pois há diferenças claras entre o risco representado entre os irmãos e outros parentes de primeiro grau (YU et al. 1999).

Provavelmente, devido a fatores genéticos herdados e compartilhados, os irmãos apresentam um maior risco de desenvolver câncer e representam o grupo familiar mais acometido. Por outro lado, pelo fato de ainda serem avaliados quando muito jovens, os dados em literatura indicam que os filhos são o grupo menos acometido, o que não tira a importância deles no cenário de uma eventual síndrome hereditária já que no decorrer do tempo, caso herdem uma suposta alteração, podem vir a desenvolver tumores.

Os probandos da presente casuística foram mais frequentemente acometidos por câncer de cavidade oral e laringe (56 casos, 75% da amostra) e de fato, nesse grupo de pacientes avaliados, os irmãos foram os mais acometidos em todas as análises (topografia do tumor do probando, gênero, famílias com mais de dois parentes acometidos). Em probandos com câncer de cavidade oral (32 casos), os irmãos eram o familiar mais afetado, sendo os tumores de cabeça e pescoço o mais prevalente neste grupo (7/18 irmãos). Entre os probandos com câncer de laringe,

houve uma predominância significativa dos irmãos como parentes de primeiro grau mais afetados quando comparados aos pais e mães, respectivamente (22 *versus* 9 *versus* 7, respectivamente). Neste último grupo, observou-se uma maior associação com câncer de mama e tumores de cabeça e pescoço (6 e 5 casos respectivamente).

Avaliando a amostra de forma ainda mais ampla, os tumores mais associados quando analisados parentes de primeiro e segundo grau foram os de cabeça e pescoço (30 casos), o que reforça a importância desse tipo de tumor no cenário de tumores hereditários. Analisando-se as características clínicas, a maior parte de probandos apresentava N inicial apesar do estádio clínico (TNM) avançado estar presente na maioria dos casos. Esses dados indicam que o diagnóstico tardio independe do fato dos pacientes terem ou não história familiar de câncer. Uma vez que o fator familial existia, esperava-se que esses pacientes, mesmo com menor grau de instrução, diante de qualquer alteração do estado normal de saúde, procurasse um profissional com objetivo de elucidar e afastar a possibilidade de câncer, porém o mesmo parece não ter ocorrido. Isso pode corresponder a um problema de instrução, apesar de 50% da casuística possuir ao menos o primeiro grau de escolaridade, mas pode estar associada com a falta de conhecimento do profissional de saúde em valorizar a história familiar como fator de risco.

O álcool e tabaco são fatores de risco muito bem estabelecidos na carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço. Aproximadamente 75% dos pacientes portadores desses tipos de tumores são expostos a essa combinação (HASHIBE et al. 2009). No presente estudo, 14% dos pacientes eram não usuários de tabaco ou álcool. Apenas 20% dos pacientes não era usuário de tabaco e 20% não utilizava nenhum tipo de bebida alcoólica. Se considerarmos o uso ocasional de

tabaco e álcool esse número é ainda maior, com até 30% dos pacientes utilizando baixo consumo de tabaco e com hábito etilista social. Esses dados estão de acordo com NEGRI et al. (2009) e demonstram que, apesar de importante como fator de risco, a história familial é ainda mais importante quando esses indivíduos são expostos a outros fatores de risco concomitantes.

Além disso, 10% da presente casuística apresentou um segundo tumor primário (STP), 40% deles no esôfago. Os tumores de esôfago ocorrem como STP em até 44% dos casos com carcinoma de pulmão sendo responsável por até 40% desses STPs (PRIANTE et al. 2011; MORRIS et al. 2011; JÉGU et al. 2013). Em carcinomas de cabeça e pescoço, os sítios primários mais relacionados ao surgimento de SPTs são cavidade oral e faringe (PRIANTE et al. 2011). Em nossa casuística, 60% dos tumores primários relacionados a SPT ocorreram na laringe. Em estudo conduzido por GAO et al. (2003), foram estudados 20074 pacientes com tumores de laringe e daqueles que sobreviveram mais de três meses após o tratamento, cerca de 17,6% dos casos desenvolverem SPTs. Nesse estudo, o risco acumulado chegou a 26% em 10 anos.

Em literatura, a principal causa de falha no tratamento dos tumores de CECP nos primeiros dois anos se deve a recidivas locorregionais (PRIANTE et al. 2011). A partir do terceiro ano, a principal causa de morbimortalidade passa a ser o surgimento de STPs que aparecem com maior frequência em sítios das vias aerodigestivas superiores. Os achados do presente estudo mostraram que 86% dos pacientes desenvolveram STPs em vias aerodigestivas superiores.

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que as alterações epigenéticas cooperam com as genéticas para a carcinogênese (LATCHFORD et al. 2007; PRESS

et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2009). Da mesma forma, os miRNAs têm sido cada vez mais estudados e relacionados aos processos neoplásicos, uma vez que regulam etapas fundamentais do ciclo celular (WANG et al. 2011; VALLADARES-AYERBES et al. 2012; ZHANG et al. 2012). A primeira etapa deste estudo foi determinar diferenças na expressão de miRNAs dos probandos comparados com um grupo de referência composto por amostras de indivíduos sem câncer ou qualquer outra patologia conhecida e sem história familial de câncer em parentes de primeiro grau. Foi utilizado um *pool* de amostras de referência pelo custo elevado da plataforma.

Na análise inicial dos dados e após a aplicação de filtros específicos foram detectados 283 miRNAs diferencialmente expressos quando comparados ao *pool* das amostras de referência. Foi utilizado um valor de expressão diferencial em 10 vezes (mais ou menos expresso) com o objetivo de obter apenas aqueles com valores relevantes na triagem inicial. A partir desse achado e, considerando a impossibilidade de estabelecer um valor de significância (pelo fato de comparar os casos com o *pool* e não com amostras individualizadas), foram estabelecidos dois escores para determinar quais miRNAs teriam potencial para estarem associados ao risco de desenvolvimento de CECP familial. No Escore A foram incluídos os probandos e seus parentes enquanto no escore B apenas os probandos. Com o intuito de aumentar a estringência, foram selecionados aqueles que estavam presentes em, pelo menos um dos seis casos em que foram analisados o probando e familiar. Esta abordagem, levou a identificação de 65 miRNAs. Seis deles apresentavam um alto escore e foram escolhidos para a confirmação dos achados.

A partir desses resultados, foram utilizados bancos de dados para avaliar a correlação desses microRNAs com fenótipos ligados ao câncer e seus prováveis alvos. Os mecanismos epigenéticos como a metilação e mais recentemente a descoberta de microRNAs têm um papel importante nessa correlação. MicroRNAs (miRNAs) regulam a expressão de genes pela ligação a alvos e têm sido relacionados com o diagnóstico e estadiamento tumoral e com o prognóstico dos pacientes (VALLADARES-AYERBES et al. 2012).

Como exemplo, WANG et al. (2011) mostraram que a expressão aumentada do microRNA miR-21 no soro de pacientes com tumores não pequenas células de pulmão (TNPCP) está correlacionada com o estádio TNM e metástase linfonodal podendo ser um fator prognóstico independente. Em um estudo subsequente (LIU et al. 2013), os autores investigaram se o miR-21 poderia ser um alvo terapêutico para os TNPCP. Foi então avaliada a expressão do miR-21 em linhagens celulares de TNPCP e amostras tumorais. Em seguida, foi avaliada o efeito da expressão de miR-21 no crescimento celular, invasão e a resposta a quimioterapia ou radiorresistência. Os resultados mostraram que o miR-21 geralmente apresenta aumento de expressão em células tumorais com importantes consequências funcionais. Em um ensaio funcional, os autores mostraram que o anti-miR-21 inibia significativamente a migração celular, invasão e quimio/radiorresistência das células tumorais. Além disso, uma molécula miR-21 símile inibiu a expressão de PTEN, enquanto que o antimiR-21 promovia o aumento da expressão do mRNA de PTEN em cultura de células tumorais. Em conjunto, estes resultados forneceram evidências que demonstram o papel de miR-21 em TNPCP por meio da modulação da via de sinalização do PTEN. O microRNA-21 (miR-21) apresenta expressão aumentada em quase todos os tumores sólidos e tem sido descrito como envolvido na gênese e progressão do câncer.

ZHANG et al. (2012) relataram que o PTEN, um conhecido GST, é regulado por múltiplos miRNAs. Os autores avaliaram a expressão e o significado de miR-21 em tecidos de câncer gástrico e o papel de miR-21 no comportamento biológico e na expressão de PTEN em células tumorais. Os autores avaliaram a expressão do miR-21 em tecidos de câncer gástrico, tecidos normais adjacentes e em linhagens de células gástricas normais. As linhagens celulares foram então transfectadas e reavaliadas. Os resultados demonstraram que o miR-21 exibiu maior expressão em tecidos de câncer gástrico em comparação com os tecidos adjacentes não tumorais. A expressão de miR-21 foi significativamente associada com o grau de diferenciação dos tecidos no tumor (P = 0,004), bem como com a invasão local e a ocorrência de metástases linfonodais (P <0,01). Após a transfecção com o pré - miR-21, as células cresceram mais rapidamente do que os controles negativos (P <0,01). A redução na expressão de miR-21 pela transfecção com anti miR-21 demonstrou um efeito importante sobre o comportamento biológico das células do câncer gástrico (P <0,05). Os resultados de Western Blot e com Luciferase demonstraram que a expressão de PTEN foi notavelmente aumentada após inibição de miR-21 (P <0,05). Os autores verificaram que a expressão do microRNA-21 em carcinomas gástricos foi significativamente associada com o grau de diferenciação dos tecidos tumorais, invasão local e metástase linfática. A expressão aumentada do miR-21 nas células BGC-823 promoveu a migração, invasão e crescimento celular in vitro; quando a expressão estava diminuída foi verificado um forte efeito inibitório sobre o comportamento biológico das células do câncer gástrico. Os autores relataram que a inibição de miR-21 pode regular positivamente a expressão de *PTEN*, o que sugeriu que o *PTEN* pode ser um gene-alvo para a iniciação e o desenvolvimento do câncer gástrico.

Utilizando uma abordagem semelhante em tumores renais, ZAMAN et al. (2012) avaliaram a possível correlação do PTEN com o miR-23b. O miR-23b está localizado no cromossomo 9 e desempenha diferentes papéis em diferentes órgãos, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento de câncer. O grupo avaliou os níveis de miR-23b-3p em 29 pares de carcinoma de células renais e seus tecidos normais correspondentes por RT-qPCR. Eles observaram que o nível de expressão de miR-23b-3p foi correlacionada com a taxa de sobrevida em 5 anos em pacientes com tumores renais. Em 15 casos (52%), a expressão de miR-23b-3p estava elevada. Todos os pacientes com expressão diminuída do miR-23b-3p sobreviveram 5 anos, enquanto apenas 50% daqueles com expressão aumentada do miR-23b-3p sobreviveram. Eles induziram então uma redução na expressão desse miRNA em linhagens celulares de tumores renais e notaram um aumento na indução de apoptose e redução da capacidade de invasão. Pela análise da expressão da proteína PTEN por imunoistoquímica, eles demonstraram ausência de expressão em regiões tumorais de amostras de tecidos com expressão aumentada do miR-23b-3p. A inibição do miR-23b-3p induziu o aumento na expressão de PTEN com uma redução concomitante de PI3-quinase, Akt total e IL-32. Dessa forma, os autores demonstraram que miR-23b-3p é um miRNA oncogênico e inibe o GST PTEN em tumores renais sugerindo que a inibição do miR-23b-3p pode ser um alvo terapêutico útil para o tratamento de carcinoma de células renais.

Assim como mir-21 e miR-23b-3p, vários miRNAs que regulam inúmeros outros genes podem estar envolvidos nas mais variadas etapas da carcinogênese. Em nosso estudo, após as análises descritas anteriormente e baseados em escores, foram identificados seis miRNAs que apresentaram altos valores: hsa-mir-582 (Escore A +6), hsa-mir-597 (Escore A +5), hsa-mir-135b (Escore A +4), hsa-mir-496 (Escore A +4), hsa-mir-431 (Escore A -4) e hsa-mir-517a (Escore A -4). Utilizando bancos de dados e análises *in silico*, foram avaliados os alvos preditos desses miRNAs.

Entretanto, após a avaliação de todos os miRNAs individualmente por RT-qPCR, apenas o hsa-mir-597 e hsa-miR-496 confirmaram os achados na comparação dos casos e o *pool* de controles. O hsa-miR-597 obteve escore A +5 tanto no TLDA quanto no ensaio individual enquanto hsa-miR-496 obteve escore +4 tanto no TLDA quanto no ensaio individual. Segundo a base de dados de microRNAs Targetscan, mirBase e miRrecords, o hsa-mir-597 tem como potenciais alvos *EGFR*, *FGFR4*, *TNF*, *TIMP2*, *HRAS*, *IL10 e CDH1*, todos relacionados a neoplasias, inclusive tumores de cabeça e pescoço. Por outro lado, hsa-miR-496 tem potenciais alvos como *RAG1*, *RS2*, *TGFBR1*, *NCOA3*, *CALCRL*, *CDK7*, *RECK*, *TOX e CENPE*, todos relacionados a neoplasias, principalmente mama e bexiga.

Entre os genes candidatos regulados pelo miR-597 estão o *EGFR*, *TIMP2*, *HRAS* e o *TNF*, todos previamente descritos como associados a CECP. O gene *EGFR* foi relatado como envolvido na gênese de tumores de cavidade oral e tumores de cabeça e pescoço (POMERANTZ e GRANDIS 2004; ZIMMERMANN et al. 2006). Ele codifica glicoproteínas transmembrana que atuam como receptores de fatores de crescimento epitelial. A ativação desses receptores desencadeia sinais que culminam com a proliferação celular. Alterações nesse gene e consequentemente nos receptores

podem ter implicações tanto no desenvolvimento quanto na progressão tumoral. A via de *EGFR* é uma importante via de sinalização que regula proliferação, diferenciação, ciclo celular e migração celular. TEIXEIRA et al. (2012) sugeriram que pelo fato desta via ser fundamental na proliferação celular, o *EGFR* teria como alvos transcricionais o miR-221 e o miR-222 e que a ativação destes estaria envolvida com fenômeno de apoptose, metastatização e aquisição de resistência a terapias. Além disso, o grupo descreveu a relação destes miRNAs com o aumento da expressão de MMPs, além da repressão de fatores inibitórios do ciclo celular. Se alterações em *EGFR* podem ser decorrentes da alteração na expressão miRNAs regulatórios, é interessante analisar o papel do miR-597, um candidato a regular este gene, o qual apresentou aumento de expressão no presente estudo.

O gene *TIMP2* pertence a família *TIMP* que codifica proteínas que inibem a atuação de metaloproteinases (MMP), envolvidas na degradação da matriz extracelular e relacionadas à invasão tumoral. Além disso, possuem um efeito secundário que é inibitório sobre a proliferação endotelial. As MMP são enzimas capazes de degradar componentes de colágeno e outros componentes da matriz extracelular resultando em extenso dano tecidual e sendo por isso implicadas na capacidade de invasão celular e angiogênese tumoral (KALEBIC et al. 1983). Diante disso, é racional pensar em uma correlação inversa entre os níveis de expressão de TIMP e o potencial de invasão das células tumorais. O-CHAROENRAT e KHANTAPURA (2006) sugeriram que polimorfismos em promotores de *MMP-2 e TIMP2* poderiam estar associados ao desenvolvimento e agressividade dos CECP. Em um estudo recente, foi relacionado o papel de miRNAs na regulação do gene *TIMP2*. DAI et al. (2012) avaliaram a expressão de mir-200b em adenocarcinomas

de endométrio. Bancos de dados de bioinformática mostraram que *TIMP2* também é um dos alvos de mir-200b. Nos ensaios realizados por esse grupo foi demonstrado que o mir-200b apresentava expressão aumentada em tecido tumoral quando comparado ao tecido normal. Em ensaios funcionais, os autores verificaram que esse miRNA reprimia a expressão de *TIMP2* tanto em nível de mRNA quanto em nível de proteínas, o que sugere que ele pode ter uma relação importante com os adenocarcinomas de endométrio que têm perfil metastático. Assim, estudos funcionais poderão confirmar o papel do hsa-miR-597 e do *TIMP2* em carcinomas de cabeça e pescoço.

Não menos importantes que os já descritos, ainda encontramos como alvos do hsa-mir-597 os genes *HRAS e TNF*. O gene *TNF* codifica uma citocina pró-inflamatória com múltiplas funções e pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (*TNF*). Esta citocina é secretada principalmente por macrófagos e está envolvida na regulação de uma grande variedade de processos biológicos incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação. Esta citocina tem sido implicada numa variedade de doenças, incluindo doenças auto-imunes e o câncer, inclusive o de cabeça pescoço (SETHI et al. 2008; DURAY et al. 2010).

Outro gene importante regulado por hsa-mir-597 é *HRAS*. Mutações no gene *RAS* estão presentes em até 30% dos tumores humanos. Os genes da família *RAS* regulam diretamente a via *RAF* que por sua vez é responsável por fenômenos como proliferação celular, diferenciação, morfologia e sobrevivência. Outra via ativada por *RAS* é a via de *PI3K* que por sua vez se relaciona com a via *AKT* e, portanto, é importante no crescimento e na sobrevivência celular além da reorganização do

citoesqueleto (CASTELLANO e DOWNWARD 2010). Mutações no gene *HRAS* foram relatadas em até 35% dos tumores na India (SATHYAN et al. 2007). Com os avanços nas técnicas de sequenciamento, mutações em *HRAS* vem se confirmando como uma das mais comuns em tumores em geral, sendo a sexta mais frequente na análise de um grupo da Johns Hopkins (AGRAWAL et al. 2011). STRANSKY et al. (2011) estudando perfil de mutações em CECP, encontraram a mutação em *HRAS* como a oitava mais frequente com 5% de incidência. Em tumores de uma forma geral, a mutação mais frequente nos genes da família RAS ocorre em *KRAS*, mas em tumores de cabeça e pescoço, *HRAS* é o mais envolvido e quase exclusivamente (YARBROUGH et al. 1994).

Avaliando-se has-miR-496, que também foi confirmado pelo ensaio individual, identifica-se como alvo interessante o gene *TGFBR1*. O gene *TGFBR1* codifica uma proteína que atua como receptor do fator de crescimento *TGF-beta*. Esse receptor transmite, a partir de sua ativação na superfície celular, um sinal que culmina na regulação de fenômenos como crescimento e divisão celular. Sinais gerados a partir desses receptores promovem diferentes respostas celulares e uma delas consiste em inibir o crescimento e a divisão celular. Diante disso, *TGFBR1* pode ter um efeito de supressor tumoral. WANG et al. (2012) analisaram diversos estudos epidemiológicos que investigaram *TGFBR1* e o risco de câncer. Os autores realizaram uma meta-análise de todos os estudos caso-controle disponíveis, relacionadas com polimorfismos do gene *TGFBR1* e o risco de câncer. Um total de 35 estudos foram identificados e na análise de subgrupos com base no tipo de câncer, foi encontrado um risco aumentado para os cânceres de ovário, mama e colorretal. Outros dois estudos destacaram a importância da relação deste gene com tumores

colorretais e de mama (XU e PASCHE 2007; MOORE-SMITH e PASCHE 2011). Estudo em modelo animal conduzido por BIAN et al. (2012) demonstraram a importância da coexistência de alterações de *TGFBR1 e PTEN* na carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço.

Além dos dois miRNAs entre os seis iniciais que foram confirmados quanto ao seu envolvimento nas amostras estudados, o hsa-miR-517a (com escore -3 no TLDA e -1 no ensaio individual) e hsa-miR-135b (com escore +5 no TLDA e +1 no ensaio individual) apresentaram o mesmo sentido de expressão. Um dos miRNAs (hsa-mir-582) não confirmou seu expressivo resultado do TLDA mas será abordado tendo em vista sua provável relação com PTEN. Esse dado reforça a necessidade de novas análises e com outras abordagens, por exemplo, usando amostras de referência individuais e não em pool como a utilizada neste estudo.

O hsa-mir-582 tem descrito 7086 alvos nos bancos de dados utilizados (TargetScan, Mirbase, microrna.org), entre eles o *PTEN*. O hsa-mir-582-3p (escore A e B como +6) foi detectado com aumento da sua expressão entre os probandos e os parentes afetados por câncer quando comparados ao *pool* de amostras normais. O gene supressor de tumor *PTEN* está mapeado em10q23 (LI et al. 1997; STECK et al. 1997). Seu produto, a proteína PTEN é formada por cerca de 403 aminoácidos e pertence a uma família de proteínas chamadas tirosino-fosfatases. Do ponto de vista funcional, elas atuam tanto como uma fosfatase protéica quanto lipídica (CANTLEY e NEEL. 1999). A PTEN faz parte de vias complexas, uma delas PTEN/PIK3/AKT. A atividade de PTEN pode ser perdida por mutação, deleção ou metilação aberrante em inúmeras neoplasias como rim, ovário, cabeça e pescoço, mama e tumores colorretais (BLANCO-APARICIO et al. 2007). Diversas síndromes de predisposição

familial, incluindo casos de tumores de mama familiais e gliomas familiais foram associadas com mutações germinativas no *PTEN* (TACHIBANA et al. 2000; BLANCO-APARICIO et al. 2007). Um ponto interessante é que todos os miRNAs que apresentaram escores elevados nessa triagem inicial tinham como alvos genes ligados ou a tumores de cabeça e pescoço ou a pelo menos um tumor considerado como relacionado.

Um potencial alvo do hsa-miR-517 é o *IGF2*. Sabe-se que IGF2 está relacionado com a ocorrência de neoplasias e dentre elas, os tumores de cavidade oral (ZAVRAS et al. 2003; YOON et al. 2012). O gene *IGF2* está localizado no 11p15.5 e é responsável pela tradução de uma proteína responsável pelo crescimento e desenvolvimento celular. Dessa forma, a possível alteração de uma molécula relacionada a esse gene poderia estar ligada a carcinogênese.

Quanto ao hsa-miR-135b, a presença de genes relacionados a tumores de cabeça e pescoço não é observada mas nota-se a presença de genes relacionados a tumores relacionados como *IRS2*, *BACH1*, *HIF1A e PTK2*.

Avaliando os dados que foram confirmados de forma pormenorizada, verifica-se que o hsa-miR-597 obteve escore máximo nas duas análises, o que o torna forte candidato a molécula de suscetibilidade no contexto estudado. Por outro lado, observa-se que hsa-miR-496, apesar de obter escore +4 nas duas análises, apenas três das cinco famílias mostraram concordância nas duas análises, confirmando seu envolvimento nestes casos. Ao caracterizar-se essas famílias, em duas delas (52.1 e 10.1) os probandos eram portadores de neoplasia de laringe e em uma por neoplasia de cavidade oral (120.1). A família 10.1 apresenta cinco parentes de primeiro grau acometidos por câncer, três por neoplasias relacionadas, sendo um irmão e uma irmã

por tumores de estômago e uma irmã com tumor de mama. Um dos irmãos não pôde ser caracterizado quanto ao sítio do tumor e o pai do probando faleceu por tumor de próstata. No que diz respeito a família 120.1 pode-se observar o acometimento de três gerações, sendo uma irmã com tumor colorretal aos 30 anos, uma tia materna com tumor de mama, outra com tumor de cólon além de uma avó materna com tumor de estômago. Já quanto ao probando 52.1 também se observa três gerações acometidas e de forma interessante, o pai do probando faleceu com tumor na mesma topografia (laringe).

Realizando análises isoladas, observa-se que, apesar da confirmação dos achados em dois miRNAs, com escores elevados, chama atenção o fato da família 10.1 ter confirmado o padrão encontrado no TLDA em quatro miRNAs: hsa-mir-597, hsa-mir-496, hsa-mir-135b e hsa-mir-517a. Enquanto na avaliação de hsa-mir-135b ocorreu confirmação do padrão de expressão aumentada nos dois ensaios, o hsa-mir-517a também teve seu padrão confirmado mas para expressão diminuída. Interessante é que, para esses dois miRNAs, verificou-se genes-alvo ligados a tumores de mama (*IGF1, PTPRT, IRS2 e BACH1*) que de fato acomete um dos parentes de primeiro grau do probando. Já para os miRNAs confirmados em todos os pares, observou-se a presença de genes alvo (*CDH1, EGFR e TIMP2*) que estão relacionados à carcinogênese de tumores de estômago, que ocorreu como fenótipo de dois familiares dessa família.

Outro ponto que deve ser destacado diz respeito à família 7.1 que apesar de não ter tido destaque na confirmação do achados do TLDA, apresentou um grande número de miRNAs diferencialmente expressos. Nessa família foi verificado cinco parentes acometidos, de três gerações consecutivas, sendo o probando portador de

neoplasia de laringe, uma irmã com tumor de bexiga, uma tia materna com dois tumores (cólon e útero) e a avó materna portadora de tumor de esôfago. Na análise inicial, verificou-se que nessa família havia 14 miRNAs com expressão aumentada tanto no probando quanto no familiar acometido por câncer em relação ao *pool* de referência normal, sendo assim, a família que apresentou o maior número de miRNAs com expressão aumentada no escore A do TLDA. Fato interessante é que 4 miRNAs dos 6 selecionados para a confirmação em ensaios individuais estavam entre esses 14. Deve-se destacar que nem o probando e nem o parente apresentavam sinais de doença em atividade quando foi realizada a coleta de sangue. Além disso, até o último *follow up* não havia sinais de recidiva da doença. No entanto, no experimento de confirmação, não foi observado o mesmo perfil do TLDA, mesmo quando reduzido o limiar de expressão. Nessa ocasião, observou-se nessa família (7.1) apenas a confirmação de hsa-miR-597.

Há um número limitado de estudos familiares que incluem casos de câncer de cabeça e pescoço. Este estudo apresenta critérios que podem ajudar na caracterização de uma síndrome de câncer familial de cabeça e pescoço e que devem ser aprimorados e validados em estudos posteriores. Além disso, os achados do presente estudo podem contribuir para estimular a valorização de dados em doentes com história familiar e que possuem tumores de cabeça e pescoço. A cultura que foi estabelecida para tumores de mama e cólon deve ser ampliada para outras neoplasias. Os critérios precisam ser aprimorados e projetos de validação devem ser realizados para que suportem o presente estudo. A fase subsequente de validação consiste em utilizarmos amostras controles individualizadas e um grupo maior independente de pacientes com histórico de câncer de cabeça e pescoço e parentes afetados. Esta fase

da validação está em andamento e não foi finalizada até o momento. Os critérios de inclusão das famílias adotados precisam ser validados por outros estudos e aprimorados. Entretanto, os resultados apresentados mostraram um grande potencial para novas descobertas que futuramente podem implicar em estratégias de aconselhamento genético para as famílias acometidas, em terapias adequadas e de maior impacto na sobrevida desses pacientes.

6 CONCLUSÕES

- O perfil clínico e epidemiológico dos pacientes com história de câncer familial incluídos no estudo revelou que o grupo de probandos apresentava predominantemente tumores de cavidade oral e de laringe (72% da amostra); os irmãos foram os parentes mais afetados possivelmente de maior risco de desenvolvimento da doença, o que permite inferir que a história familiar é um fator importante, uma vez que eles compartilham muitas informações genéticas;
- Foi verificado que 14% dos pacientes não utilizava tabaco ou álcool, o que não diferencia estes tumores dos casos esporádicos, e permite concluir que apesar de importante, a história familiar se torna um fator de risco mais proeminente quando esses indivíduos são expostos aos fatores de risco tradicionais;
- A análise do perfil de expressão de miRNAs em um subgrupo de probandos selecionados revelou 283 miRNAs diferencialmente expressos, destes 65 miRNAs foram identificados como significativos na ordem de 10 vezes e presentes em pelo menos um dos casos pareados (probando e familiar);
- Foram selecionados seis miRNAs para a confirmação dos achados baseados em escores: hsa-miR-582-3p, hsa-miR-597, hsa-miR-135b, hsa-miR-496, hsa-miR-431 e hsa-miR-517a. A expressão destes miRNAs estava alterada nos probandos e familiares, reforçando a hipótese de que existam miRNAs que podem estar relacionados a história familiar de câncer;

- A validação técnica confirmou a alteração na expressão do hsa-miR-597 e hsa-miR-496 nas seis famílias analisadas. O hsa-miR-135b e hsa-miR-517a apresentaram resultados significativos em um menor número de casos do que o esperado.
- Em uma das famílias que apresentava história de cinco parentes de primeiro grau afetados por câncer foi confirmada alteração na expressão de quatro miRNAs, o que sugere que, em conjunto, possam estar associados a predisposição ao câncer nessa família;
- Dentre os potenciais alvos de hsa-miR-597 estão EGFR, TNF, TMP2, HRAS e FGFR4, sabidamente relacionados com neoplasias de cabeça e pescoço e inúmeras outras neoplasias o que reforça a hipótese aventada nesse estudo. Dentre os potenciais alvos de hsa-miR-496 estão RAG1, RS2, TGFBR1, CALCRL, NCOA3 e CDK7, envolvidos na carcinogênese de tumores relacionados como bexiga e mama frequentemente encontrados em familiares de nossos probandos.
- Os achados coincidentes de alterações na expressão de miRNAs no probando e familiares portadores de neoplasias sugerem uma associação positiva entre esses miRNAs e o aumento de risco de câncer familiar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2011**. Retrieved Oct 3, 2011. Avaliable from: <URL:http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspc-029771.pdf> [2013 jan 12]

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. **Science** 2011; 333:1154-7.

Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:2697-706.

Andrews G, Lango M, Cohen R, et al. Nonsurgical management of oropharyngeal, laryngeal, and hypopharyngeal cancer: the Fox Chase Cancer Center experience. **Head Neck** 2011; 33:1433-40.

[Anonymous]. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. **N Engl J Med** 1991; 324:1685-90.

Bérgamo NA, Veiga LCS, Reis PP, et al. Classical and molecular cytogenetic analyses reveal chromosomal gains and losses correlated with survival in head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res* 2005; 11:621-631.

Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G, et al. miR-10b*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours. **EMBO Mol Med** 2012; 4:1214-29.

Bian Y, Hall B, Sun ZJ, Molinolo A, et al. Loss of TGF-β signaling and PTEN promotes head and neck squamous cell carcinoma through cellular senescence evasion and cancer-related inflammation. **Oncogene** 2012; 31:3322-32.

Biocarta. **EGF signaling pathway**. Avaliable from: <URL:http://www.biocarta.com/pathfiles/h_egfPathway.asp> [2013 jan 12]

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. **Carcinogenesis** 2007; 28:1379-86.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res** 1988; 48:3282-7.

Bondy ML, Spitz MR, Halabi S, et al. Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1993; 2:103-6.

Brown LM, Gridley G, Diehl SR, et al. Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico. **Cancer** 2001; 92:2102-8.

Buda I, Bachar G, Gilam A, et al. Differential expression of microRNAs between aggressive and non-aggressive papillary thyroid carcinoma. **Head Neck Oncol** 2012; 4:52.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:15524-9.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:11755-60.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**. 2005; 353:1793-801. Erratum in: **N Engl J Med** 2006; 355:533.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999. 96:4240-5.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. **Int J Cancer** 2005; 114:806-16.

Castellano E, Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. **Curr Top Microbiol Immunol** 2010; 346:143-69.

Catucci I, Yang R, Verderio P, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. **Hum Mutat** 2010; 31:E1052-7.

Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 334:1351-8.

Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:530-5.

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

Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. **APMIS** 2007; 115:1090-106.

Cozzolino AM, Pedace L, Castori M, et al. Analysis of the miR-34a locus in 62 patients with familial cutaneous melanoma negative for CDKN2A/CDK4 screening. **Fam Cancer** 2012; 11:201-8.

Cuk K, Zucknick M, Heil J, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. **Int J Cancer** 2012; Aug 28. [Epub ahead of print].

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

Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. **Head Neck** 2008; 30:75-84.

Dai Y, Xia W, Song T, Su X, et al. MicroRNA-200b Is Overexpressed in Endometrial Adenocarcinomas and Enhances MMP2 Activity by Downregulating TIMP2 in Human Endometrial Cancer Cell Line HEC-1A Cells. **Nucleic Acid Ther** 2012; Dec 3. [Epub ahead of print].

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

Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: a review. **Clin Dev Immunol** 2010; 2010:701657.

Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:3627-32.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6: 259-69.

Fabbri M, Calore F, Paone A, Galli R, Calin GA. Epigenetic regulation of miRNAs in cancer. **Adv Exp Med Biol** 2013; 754:137-48.

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

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

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

Fuller CD, Wang SJ, Thomas CR Jr, Hoffman HT, Weber RS, Rosenthal DI. Conditional survival in head and neck squamous cell carcinoma: results from the SEER dataset 1973-1998. **Cancer** 2007; 109:1331-43.

Furniss CS, McClean MD, Smith JF, et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2007; 120:2386-92.

Gao X, Fisher SG, Mohideen N, Emami B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 56:427-35.

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

Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol** 2005; 23:276-92.

García-Ortí L, Cristóbal I, Cirauqui C, et al. Integration of SNP and mRNA Arrays with MicroRNA Profiling Reveals That MiR-370 Is Upregulated and Targets NF1 in Acute Myeloid Leukemia. **PLoS One** 2012; 7:e47717.

Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, et al. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 1994; 30B:319-22.

Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: future perspectives. **Oral Oncol** 2008; 44:910-4.

Goode EL, Chenevix-Trench G, Song H, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. **Nat Genet** 2010; 42:874-9.

Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. **Cancer Res** 2005; 65:3509-12.

Grosshans H, Filipowicz W. Proteomics joins the search for microRNA targets. **Cell** 2008; 134:560-2.

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

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:541-50.

He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role ofmicroRNA genes in papillary thyroid carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:19075-80.

Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:613-26.

Hoshino I, Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. **Surg Today** 2012; Nov 6. [Epub ahead of print].

Hsu TC, Cherry LM, Samann NA. Differential mutagen-susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. **Cancer Genet Cytogenet** 1985; 17:307-13.

Hsu CM, Lin PM, Wang YM, Chen ZJ, Lin SF, Yang MY. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. **Tumour Biol** 2012; 33:1933-42.

Hussain SK, Sundquist J, Hemminki K. Familial clustering of cancer at human papillomavirus-associated sites according to the Swedish Family-Cancer Database. **Int J Cancer** 2008; 122:1873-8.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res** 2005; 65:7065-70.

Jégu J, Binder-Foucard F, Borel C, Velten M. Trends over three decades of the risk of second primary cancer among patients with head and neck cancer. **Oral Oncol** 2013; 49:9-14.

Jérôme T, Laurie P, Louis B, Pierre C. Enjoy the Silence: The story of let-7 MicroRNA and cancer. **Curr Genomics** 2007; 8:229-33.

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

Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. **Science** 1983; 221:281-3.

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

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. **RNA** 2003; 9:175-9.

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

Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science** 1997; 275:1943-7.

Li Q, Li X, Guo Z, et al. MicroRNA-574-5p Was Pivotal for TLR9 Signaling Enhanced Tumor Progression via Down-Regulating Checkpoint Suppressor 1 in Human Lung Cancer. **PLoS One** 2012; 7:e48278.

Liu Z, Li G, Wei S, et al. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer** 2010; 116:4753-60.

Liu ZL, Wang H, Liu J, Wang ZX. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung câncer cells by targeting PTEN. **Mol Cell Biochem** 2013; 372:35-45.

Ma H, Yuan H, Yuan Z, et al. Genetic variations in key MicroRNA processing genes and risk of head and neck cancer: a case-control study in Chinese population. **PLoS One** 2012; 7:e47544.

Madhavan D, Zucknick M, Wallwiener M, et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. **Clin Cancer Res** 2012; 18:5972-82.

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2004; 39:167-9.

Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. **Mol Cancer Res** 2003; 1:882-91.

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

Moore-Smith L, Pasche B. TGFBR1 signaling and breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2011; 16:89-95.

Morris LG, Sikora AG, Hayes RB, Patel SG, Ganly I. Anatomic sites at elevated risk of second primary cancer after an index head and neck cancer. **Cancer Causes Control** 2011; 22:671-9.

Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 390:1-4.

Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellularcarcinoma and non-tumorous tissues. **Oncogene** 2006; 25:2537-45.

Murff HJ, Spigel DR, Syngal S. Does this patient have a family history of cancer? An evidence-based analysis of the accuracy of family cancer history. **JAMA** 2004; 292:1480-9.

Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene** 2004; 23:6445-70.

Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer. **Surgery** 2011; 150:916-22.

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

O-Charoenrat P, Khantapura P. The role of genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. **Oral Oncol** 2006; 42:257-67.

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

O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, et al. p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. **Hum Pathol** 2008; 39:452-8.

Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R. Association between hsamir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. **Carcinogenesis** 2010; 31:2124-6.

Paz MF, Fraga MF, Avila S, et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. **Cancer Res** 2003; 63:1114-21.

Pedace L, Castiglia D, De Simone P, et al. AXIN2 germline mutations are rare in familial melanoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2011; 50:370-3.

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

Pomerantz RG, Grandis JR. The epidermal growth factor receptor signaling network in head and neck carcinogenesis and implications for targeted therapy. **Semin Oncol** 2004; 31:734-43.

Press JZ, De Luca A, Boyd N, et al. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have dstinct molecular abnormalities. **BMC Cancer** 2008 Jan 22;8:17.

Priante AV, Castilho EC, Kowalski LP. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. **Curr Oncol Rep** 2011; 13:132-7.

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

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

Santos EMM, Oliveira LP, Rossi BM. **Câncer hereditário: atualização II.** São Paulo: LIBBS; 2007. Apresentação; p.IV.

Sathyan KM, Nalinakumari KR, Kannan S. H-Ras mutation modulates the expression of major cell cycle regulatory proteins and disease prognosis in oral carcinoma. **Mod Pathol** 2007; 20:1141-8.

Schantz SP, Hsu TC. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. **Head Neck** 1989; 11:337-42.

Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front Biosci** 2008; 13:5094-107.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer J Clin** 2012; 62:10-29.

Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian câncer diagnosis. **Carcinogenesis** 2008; 29:1963-6.

Shen J, DiCioccio R, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. Novel genetic variants in miR-191 gene and familial ovarian cancer. **BMC Cancer** 2010; 10:47.

Shen J, Wang D, Gregory SR, et al. Evaluation of microRNA expression profiles and their associations with risk alleles in lymphoblastoid cell lines of familial ovarian cancer. **Carcinogenesis** 2012; 33:604-12.

Song H, Ramus SJ, Tyrer J, et al. A genome-wide association study identifies a new ovarian cancer susceptibility locus on 9p22.2. **Nat Genet** 2009; 41:996-1000.

Song MY, Pan KF, Su HJ, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. **PLoS One** 2012; 7:e33608.

Spaulding MB, Fischer SG, Wolf GT. Tumor response, toxicity, and survival after neoadjuvant organ-preserving chemotherapy for advanced laryngeal carcinoma. The Department of Veterans Affairs Cooperative Laryngeal Cancer Study Group. **J Clin Oncol** 1994; 12:1592-9.

Spitz MR, Fueger JJ, Halabi S, Schantz SP, Sample D, Hsu TC. Mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer: a case-control analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1993; 2:329-33.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet** 1997; 15:356-62.

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science** 2011; 333:1157-60.

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

Tachibana I, Smith JS, Sato K, Hosek SM, Kimmel DW, Jenkins RB. Investigation of germline PTEN, p53, p16(INK4A)/p14(ARF), and CDK4 alterations in familial glioma. **Am J Med Genet** 2000; 92:136-41.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Res** 2004; 64:3753-6.

Tashiro H, Abe K, Tanioka H. Familial occurrence of cancer of the mouth. **J Oral Maxillofac Surg** 1986; 44:322-3.

Teixeira AL, Gomes M, Medeiros R. EGFR signaling pathway and related-miRNAs in age-related diseases: the example of miR-221 and miR-222. **Front Genet** 2012; 3:286.

Tran N, McLean T, Zhang X, et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 358:12-7.

Tucker T, Friedman JM. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. **Clin Genet** 2002; 62:345-57.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, et al. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. **J Transl Med** 2012; 10:186.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424-5.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:2257-61.

Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. **Hum Mol Genet** 2007;16 Spec No 1:R14-20.

Wang ZX, Bian HB, Wang JR, Cheng ZX, Wang KM, De W. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. **J Surg Oncol** 2011; 104:847-51.

Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. **Br J Surg** 2007; 94:23-30.

Wu Z, Sun L, Wang H, et al. MiR-328 expression is decreased in high-grade gliomas and is associated with worse survival in primary glioblastoma. **PLoS One** 2012; 7:e47270.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell** 2006; 9:189-98.

Yang R, Schlehe B, Hemminki K, et al. A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 121:693-702.

Yang ZX, Lu CY, Yang YL, Dou KF, Tao KS. MicroRNA-125b expression in gastric adenocarcinoma and its effect on the proliferation of gastric cancer cells. **Mol Med Report** 2012; Oct 26. [Epub ahead of print].

Yarbrough WG, Shores C, Witsell DL, Weissler MC, Fidler ME, Gilmer TM. ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Laryngoscope** 1994; 104:1337-47.

Yoon AJ, Zavras AI, Chen MK, Lin CW, Yang SF. Association between Gly1619ARG polymorphism of IGF2R domain 11 (rs629849) and advanced stage of oral cancer. **Med Oncol** 2012; 29:682-5.

Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. **Cancer Lett** 1999; 146:93-101.

Yu KK, Zanation AM, Moss JR, Yarbrough WG. Familial head and neck cancer: molecular analysis of a new clinical entity. **Laryngoscope** 2002; 112:1587-93.

Zavras AI, Pitiphat W, Wu T, et al. Insulin-like growth factor II receptor gene-167 genotype increases the risk of oral squamous cell carcinoma in humans. **Cancer Res** 2003; 63:296-7.

Zhang BG, Li JF, Yu BQ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. **Oncol Rep** 2012; 27:1019-26.

Zaman MS, Thamminana S, Shahryari V, et al. Inhibition of PTEN Gene Expression by Oncogenic miR-23b-3p in Renal Cancer. **PLoS One** 2012; 7:e50203.

Zhu Y, Spitz MR, Hsu TC, Wu X. Genetic instability of specific chromosomes associated with a family history of cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 136:73-7.

Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. **Radiat Oncol** 2006; 1:11.

Anexo 1 – Quadros suplementares

Suplementar 1 - Valores de expressão relativa (log₂ da relação amostra alvo/referência) dos sessenta e cinco miRNAs com escore igual ou superior a |1| para os seis pares de pacientes (paciente e familiar com câncer – casos 23,10,55,7,120 e 52) (escore A) e para os casos não-pareados (escore B – casos 103, 39, 65, 90, 109 e 112).

miRNA	23.1	23.2	10.1	10.2	55.1	55.2	7.1	7.2	120.1	120.2	52.1	52.2	103.1	39.1	65.1	90.1	109.1	112.1
hsa-miR-582-3p	7.6	4.8	8.0	4.9	5.5	4.3	6.0	8.7	7.5	8.0	6.2	5.2	4.2	7.2	3.9	10.0	5.2	9.3
hsa-miR-597	8.3	2.0	9.1	4.3	6.9	7.0	10.6	7.2	8.5	9.5	6.5	9.6	5.0	9.2	6.5	13.2	6.7	9.2
hsa-miR-208	-4.0	-5.3	-4.3	-6.2	-4.9	-5.6	-3.0	0.1	-5.3	-4.1	-5.7	-4.2	-4.8	-5.0	-4.6	-2.3	-6.2	-3.6
hsa-miR-32	-10.1	-7.9	-1.0	-5.9	-4.7	-11.7	-9.0	-5.6	-11.3	-3.4	-11.8	-6.9	-3.1	-4.7	-10.7	3.2	-5.9	-1.0
hsa-miR-520g	-4.4	-5.6	-4.6	-6.6	-5.2	-6.0	-3.3	-4.6	-5.6	-4.4	-6.0	-4.6	-5.1	-5.4	-4.9	-2.7	-6.6	-4.0
hsa-miR-135b	-0.3	3.5	9.6	5.6	8.3	7.4	5.1	8.4	5.2	7.8	5.0	3.3	7.3	8.4	-0.8	8.9	5.9	8.6
hsa-miR-496	3.6	-1.5	6.6	5.8	5.7	0.7	9.5	3.7	7.3	6.3	8.1	4.9	-1.0	8.1	-0.8	1.5	6.6	5.6
hsa-miR-200a	-9.1	-10.3	-9.3	-11.3	-9.9	-10.7	-8.0	-5.2	-10.3	-2.2	-10.7	-2.0	-9.8	-10.0	-9.6	1.3	-11.2	-2.2
hsa-miR-431	-11.2	-12.4	-11.5	-6.3	-12.1	-12.8	-2.9	-0.8	-0.4	-0.2	-6.7	-5.6	-2.1	-4.3	-8.5	-9.5	-6.3	0.8
hsa-miR-506	-5.3	-6.5	-2.8	-7.5	-0.5	-3.6	-4.2	-5.5	-6.5	-5.3	-6.9	-5.4	-6.0	0.0	-5.8	-3.5	-3.9	-4.9
hsa-miR-517a	-4.3	-8.2	-9.9	-5.3	-5.7	-7.9	-1.9	-9.9	-4.8	-0.4	-3.6	-4.1	-4.2	-7.2	-10.2	-7.9	-9.6	-5.7
hsa-miR-10b	4.2	4.1	3.9	8.1	2.0	9.5	4.8	9.2	5.5	-0.3	7.2	-0.4	8.4	8.8	-0.8	1.5	6.3	5.5
hsa-miR-486-3p	6.7	0.5	5.4	4.4	3.3	5.0	5.4	4.3	4.3	2.0	5.9	4.3	3.0	6.2	5.7	-4.3	3.7	5.7
hsa-miR-576-5p	3.0	-2.2	2.7	2.8	4.5	3.1	5.1	4.5	5.2	4.2	3.4	4.0	-1.2	4.4	-0.9	-0.1	1.9	4.3
hsa-miR-29b	-3.5	-5.0	-4.0	-12.7	-5.0	-6.1	-1.3	3.7	-5.0	0.3	-7.2	1.5	-4.9	-11.5	-2.6	3.8	-8.6	1.1
hsa-miR-367	-5.3	-6.5	-5.6	-0.2	-1.0	-6.9	-4.2	-5.5	-6.5	1.0	-6.9	-5.5	-6.1	-6.3	-1.1	-3.6	-2.3	-4.9
hsa-miR-379	-4.8	-6.0	-3.6	-6.7	-3.2	-13.2	-1.6	-1.9	-2.0	-0.4	-4.9	-4.6	-2.8	-4.9	-7.0	-3.1	-2.5	1.0
hsa-miR-508-3p	-5.4	-9.5	-5.1	-4.6	-0.1	-2.0	-7.2	-3.8	-4.2	-0.2	-2.9	-0.6	-1.4	-1.4	-8.8	0.0	-2.8	-0.9
hsa-miR-512-3p	-4.8	-3.1	-5.0	-7.0	-5.6	-6.4	2.0	-5.0	-6.0	3.0	-6.4	-4.9	-5.5	-5.7	-5.3	-3.0	-6.9	0.0
hsa-miR-518a-3p	-3.8	-5.0	-4.0	-6.0	-4.6	-5.4	-0.5	2.3	-1.6	-3.8	-1.1	1.1	0.1	-4.8	-4.3	-2.1	-6.0	-0.1
hsa-miR-526b	-3.6	-4.9	0.1	-5.8	-4.5	-5.2	4.7	-3.9	-4.8	2.7	-5.3	-3.8	-4.4	-4.6	-4.2	-1.9	-5.8	-3.2
hsa-miR-542-5p	-3.9	-3.1	-4.1	-7.9	-3.5	-5.4	-9.3	-5.2	-4.1	-1.5	-3.9	-1.1	-2.5	-11.4	-5.9	0.3	-9.3	-5.4
hsa-miR-373	4.1	4.8	-0.5	4.5	6.2	2.2	6.8	4.0	1.0	7.9	7.4	1.9	-1.0	3.1	-0.8	1.5	3.4	6.9
hsa-miR-483-5p	4.1	2.0	-0.2	1.0	3.7	1.1	4.0	3.5	4.3	3.8	-0.2	1.9	0.5	0.5	1.6	-1.8	0.8	4.2
hsa-miR-1	-1.8	-2.9	-7.8	-9.7	-1.4	-9.1	-6.4	-4.5	-2.6	-2.2	-9.1	-1.5	-8.3	-0.8	-8.1	2.6	-6.1	1.7
hsa-miR-134	-3.7	-3.7	-4.0	-3.0	-4.0	-5.0	-0.8	-1.0	-0.4	-0.1	-1.4	1.0	-1.5	-4.1	-2.1	-8.2	-2.3	-0.2

Cont/ Suplementar 1

miRNA	23.1	23.2	10.1	10.2	55.1	55.2	7.1	7.2	120.1	120.2	52.1	52.2	103.1	39.1	65.1	90.1	109.1	112.1
hsa-miR-141	-8.2	-3.7	0.0	-4.4	-4.9	-5.6	-4.2	-1.0	-3.1	-1.9	-5.1	-0.2	-4.9	-3.5	-3.8	3.6	-3.6	1.3
hsa-miR-299-5p	-6.1	-10.2	-5.3	-1.3	-4.1	-4.3	-3.2	-9.2	-0.4	-3.1	-1.5	-9.1	-1.9	-0.8	-9.5	-7.2	-1.7	-8.5
hsa-miR-370	-5.5	-5.9	-3.1	-3.1	-7.2	-7.1	-1.2	0.1	-1.0	-1.8	-3.7	-3.0	-1.8	-4.7	-2.8	-6.2	-3.3	0.2
hsa-miR-372	-6.2	-7.4	-6.4	-8.4	-0.6	-7.8	-0.6	-0.4	-7.4	-1.6	-3.2	-0.8	-6.9	-7.1	-6.7	-4.4	-8.3	-5.8
hsa-miR-382	-4.3	-6.9	-8.1	-2.2	-7.6	-7.3	-2.3	-2.5	0.6	0.2	-0.2	1.5	-2.4	-5.1	-4.7	-12.0	-1.7	1.5
hsa-miR-509-5p	0.3	-0.1	-5.4	-5.3	-1.8	-4.9	2.1	-9.4	-1.5	2.9	-5.3	-9.3	-5.3	-6.0	-9.7	-7.4	-4.7	-1.2
hsa-miR-654-5p	-4.1	-5.0	-2.4	-0.9	-9.6	-6.1	-1.0	3.4	0.8	-2.4	0.5	-1.5	1.4	-0.9	-0.5	-7.0	0.1	0.8
hsa-miR-96	-5.9	-11.1	-5.1	-9.9	-3.0	-4.8	-0.9	-4.1	-3.4	1.1	-9.0	-1.1	-10.6	-5.1	-6.7	-8.2	-7.1	2.8
hsa-miR-124	-1.2	1.7	-2.1	-2.0	-3.1	-2.2	3.8	8.7	0.8	0.8	-7.3	3.7	2.1	2.3	-3.3	3.4	-7.8	0.1
hsa-miR-214	-8.5	-0.6	2.8	-1.8	-0.3	1.2	3.6	3.5	1.1	-1.4	1.7	2.7	0.9	0.6	-3.5	-4.1	0.7	-4.4
hsa-miR-383	4.7	-1.5	-0.5	4.4	2.3	5.0	8.0	1.9	4.5	6.9	5.2	-0.4	2.4	4.7	5.6	1.5	0.2	6.5
hsa-miR-409-5p	-0.2	-5.7	1.7	1.3	0.6	-2.8	4.8	3.9	4.4	0.1	3.9	3.1	2.7	3.4	-5.0	-2.7	2.6	5.0
hsa-miR-518b	-0.3	0.8	12.5	-2.4	-1.1	-1.9	5.2	8.8	1.7	6.0	-1.9	1.8	2.5	-1.2	-0.8	1.5	-2.4	0.1
hsa-miR-548d-5p	2.6	0.4	-0.1	-1.7	0.8	-0.3	3.9	4.3	1.6	4.3	-3.0	1.4	-1.1	-1.1	-2.4	4.5	-1.2	5.0
hsa-miR-651	-0.3	-1.5	5.6	1.4	-1.1	-1.9	6.4	-0.5	3.8	-0.3	5.0	4.0	5.6	5.9	-0.8	1.5	2.3	7.9
hsa-let-7b	-2.0	-5.9	-4.1	-4.6	-2.6	-4.3	-2.9	-4.6	-1.7	-0.9	-4.1	0.3	-5.2	-4.7	-2.8	-2.8	-5.0	0.1
hsa-miR-122	-1.6	-5.8	-0.4	-2.5	-4.5	-3.5	-2.0	-2.9	0.2	-1.0	-2.9	-3.0	-1.5	-0.6	-3.8	-9.7	-6.7	0.8
hsa-miR-154	-3.3	-7.1	-1.5	-2.7	-3.4	-4.2	2.6	0.0	1.7	-2.3	1.5	-1.1	0.4	0.9	-6.4	-4.1	0.6	0.1
hsa-miR-187	-5.8	-5.6	-0.8	-0.7	-1.1	-5.1	0.8	-8.5	-0.1	1.5	-3.7	-1.1	-5.7	-4.0	-5.7	-3.3	-2.7	0.1
hsa-miR-196b	-1.3	-2.9	-3.6	-4.1	0.2	-3.4	-2.2	-3.4	-1.6	1.7	-4.5	-0.4	-1.5	-6.4	-3.8	-1.9	-2.5	1.3
hsa-miR-205	-7.3	-8.6	-2.2	-1.6	2.7	-1.9	-0.1	0.0	1.3	-7.3	-3.0	-2.4	-0.3	-8.3	-2.8	-5.6	-0.3	-6.9
hsa-miR-301a	-3.4	-6.3	-0.1	-4.9	-2.5	-4.3	-1.9	-2.2	-3.7	-1.7	-3.9	-2.1	-4.1	-2.4	-7.1	0.1	-3.8	0.3
hsa-miR-31	-4.0	-5.0	-0.5	-3.5	-0.9	-2.5	-1.8	0.6	-2.1	1.5	-3.0	0.1	-1.7	-2.9	-3.7	1.7	-1.8	0.4
hsa-miR-330-5p	-3.8	-5.0	2.0	-1.1	0.6	1.4	-2.7	7.3	1.8	-3.8	3.3	-0.3	2.9	0.5	-4.3	-2.0	0.7	0.0
hsa-miR-337-5p	-1.2	-4.4	-4.0	-5.5	-2.6	-9.8	1.3	-1.3	-0.7	1.3	-4.2	0.0	-6.4	-2.4	-8.8	-0.4	-5.8	1.5
hsa-miR-369-5p	-4.2	-5.6	-1.4	-2.1	-10.0	-2.8	0.8	0.5	-0.3	-2.7	-0.8	-3.1	-0.8	0.8	-9.7	-7.4	-0.7	-0.3
hsa-miR-411	-3.3	-5.0	-1.2	-6.2	-2.9	-5.9	-1.7	-1.1	-2.4	-0.9	-5.7	-4.5	-2.3	-0.9	-4.0	1.1	-2.8	2.5
hsa-miR-450b-5p	-8.0	-9.2	2.8	-1.8	1.6	-0.8	0.7	0.1	-6.6	-1.6	-1.4	-3.1	-1.9	1.7	-8.5	6.0	-0.9	1.5
hsa-miR-452	-4.7	-3.2	-1.3	-4.1	-2.9	-3.4	-3.9	0.1	-0.2	1.0	-7.4	-3.7	-2.6	-1.9	-9.4	-7.1	-4.3	1.3
hsa-miR-453	-2.7	-3.9	-2.9	-4.9	-3.5	-4.3	-1.6	-2.9	-3.9	-2.7	1.8	-2.9	-3.4	-3.6	-1.1	-0.9	-4.8	-2.3
hsa-miR-487a	-2.7	-8.9	-8.0	-1.2	-4.2	-9.3	1.2	-0.2	-1.5	-1.7	1.0	0.8	-2.9	-1.5	-2.4	-6.0	-0.7	-1.0
hsa-miR-487b	-3.6	-4.2	-1.9	-2.2	-2.9	-5.2	0.3	-2.3	0.2	-0.8	-1.6	-2.3	-2.2	-2.2	-3.2	-3.3	-2.0	0.2
hsa-miR-504	-3.9	-8.8	-1.4	1.2	3.3	-0.2	3.3	-2.7	0.8	-7.6	-1.1	0.8	1.3	0.3	-2.5	3.3	2.0	1.4
hsa-miR-517c	-1.9	-3.9	-9.6	-5.4	-1.7	-3.9	-0.4	-5.1	-3.6	1.0	-2.4	-3.2	-4.4	-5.6	-9.9	-7.6	-8.7	-1.9

Cont/ Suplementar 1

miRNA	23.1	23.2	10.1	10.2	55.1	55.2	7.1	7.2	120.1	120.2	52.1	52.2	103.1	39.1	65.1	90.1	109.1	112.1
hsa-miR-522	-5.5	-6.8	-1.1	-7.7	-0.6	-1.3	-1.3	0.1	-4.6	0.2	-2.9	-1.3	-1.4	-6.5	-3.7	-3.8	-2.1	-5.1
hsa-miR-539	-2.4	-4.0	-1.9	-2.6	-3.4	-5.6	-0.5	-3.5	-0.7	0.0	-1.7	-1.3	-1.9	-2.8	-3.2	-4.2	-1.5	0.5
hsa-miR-672	2.7	-1.4	-0.1	0.3	-3.4	-4.1	3.6	-2.8	-3.7	-2.5	-4.2	3.1	2.4	-3.5	-3.1	-0.8	-4.7	-2.1
hsa-miR-876-3p	-4.5	-5.7	0.0	-6.7	-0.9	-3.1	-3.4	-1.3	-5.7	0.1	-6.1	-1.7	-5.2	-5.5	-5.0	2.6	-1.7	-4.1
hsa-miR-889	-3.3	-10.6	-0.7	-4.3	-2.1	-10.9	1.7	-1.4	-1.0	-1.2	-4.5	-4.5	-2.9	0.9	-9.9	-7.6	-1.4	1.8

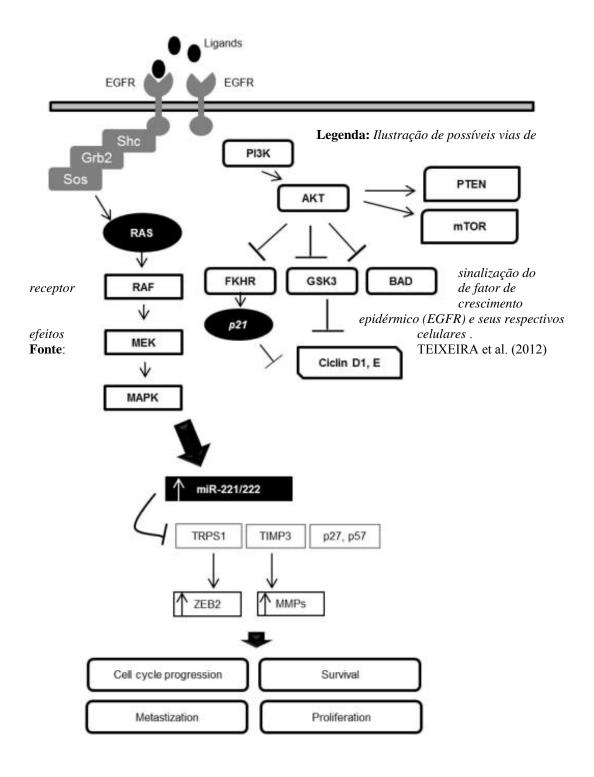
Legenda: Verde = expressão inferior a 10 vezes a amostra referência (valor log₂<-3,32); Vermelho = expressão superior a 10 vezes a amostra referência (valor log₂>3,32).

Suplementar 2 - Valores de expressão relativa (log₂ da relação amostra alvo/referência) dos seis miRNAs selecionados para a confirmação para cinco pares de pacientes previamente avaliados (paciente e familiar com câncer) (escore A).

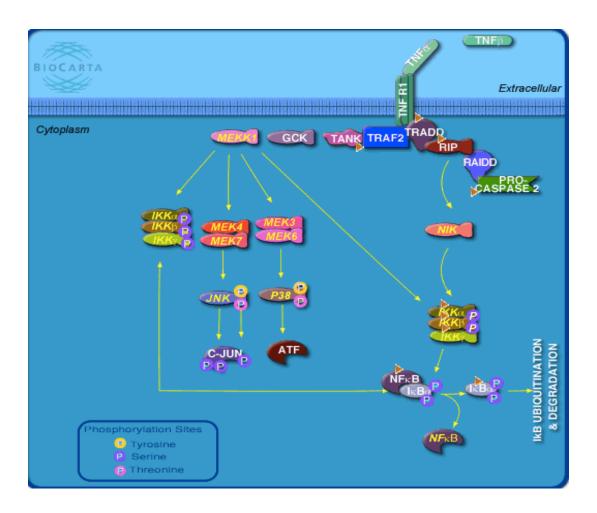
miRNA	10.1	10.2	55.1	55.2	7.1	7.2	120.1	120.2	52.1	52.2
hsa-miR-597	3.5	3.6	4.1	4.1	3.9	3.5	3.8	3.5	3.9	4.7
hsa-miR-496	3.1	3.2	2.8	2.5	2.1	2.6	4.8	3.0	4.6	3.2
hsa-miR-517a	-3.1	-2.6	0.1	-2.7	-0.1	-4.5	-2.2	1.3	1.1	-2.5
hsa-miR-582-3p	1.3	-2.8	1.7	-1.3	1.5	0.4	2.1	1.3	0.1	1.2
hsa-miR-135b	4.3	3.2	3.5	1.8	3.4	-0.3	0.3	1.7	3.2	-1.8
hsa-miR-431	-1.0	-0.8	-2.0	-1.7	2.6	-0.2	1.8	2.9	-3.8	-0.4

Legenda: Verde = expressão inferior a cinco vezes a amostra referência (valor $log_2 < -2,32$); Vermelho = expressão superior a cinco vezes a amostra referência (valor $log_2 > 2,32$).

Anexo 2 - Ilustração da via de *EGFR* demosntrando sua importante relação com outras vias importantes como via *RAS*, *AKT*, *PTEN e mTOR*.



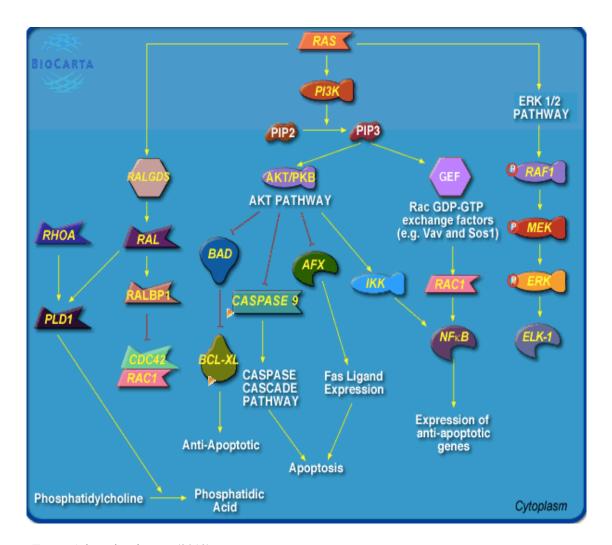
Anexo 3 - Ilustração da via de TNF.



Fonte: Adaptado Biocarta (2013)

Legenda: TNF regula vias importantes ligadas ao fenômeno de apoptose.

Anexo 4 - Ilustração da via de *RAS*.



Fonte: Adaptado Biocarta (2013)

Legenda: *RAS* ativa muitas cascatas de sinalização. Aqui, ilustramos algumas das cascatas e os diferentes sinais que surgem a partir dela. Muitos destes sinais são interpretados de formas diferentes, dependendo do tipo de célula ou microambiente receptor do estímulo.



R. Professor Antônio Prudente, 211 – telefone: 2189-5000

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução n. 196/96 e resolução CNS 251/97 do Ministério da Saúde)

INFORMAÇÕES A(O) PACIENTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo sobre os MicroRNAs em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Este documento fornece informações sobre o estudo para o qual está sendo convidado a participar.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, médicos e pesquisadores desta instituição desenvolvem pesquisa clínica científica. Através da pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos das doenças e oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Grande parte destes trabalhos requer a utilização de fragmentos de tecidos ou de sangue. A utilização deste material biológico não influencia em nada o seu diagnóstico ou tratamento. Caso você concorde em participar desta atividade de pesquisa, será solicitada a coleta de 20 mL de seu sangue. Esta coleta é feita de forma semelhante a exames de sangue de rotina.

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU DO RESPONSÁVEL LEGAL

II. DADOS SOBRE O ESTUDO

TÍTULO DO ESTUDO:

"MicroRNAs em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço"

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS

Dr. Thiago Celestino Chulam Dra. Silvia Regina Rogatto

Dr. Luiz Paulo Kowalski

III. ESCLARECIMENTOS

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

O câncer de cabeça e pescoço é hoje uma importante causa de morte com aumento progressivo de sua incidência, principalmente em países em desenvolvimento. No mundo, representa a sexta neoplasia mais comum sendo responsável por aproximadamente 650000 novos casos e 350000 mortes a cada ano.

Apesar da maioria dos casos deste tumor ocorrer de maneira esporádica e geralmente relacionada à exposição crônica a álcool e ao tabaco, a história familiar têm merecido especial interesse nas últimas duas décadas. Avanços importantes no conhecimento e entendimento dos casos familiais e hereditários vêm ocorrendo de forma progressiva.

Dessa forma surge especial interesse na compreensão de possíveis mecanismos envolvidos no acometimento hereditário por esse tipo de tumor e um desses mecanismos pode estar vinculado a expressão de determinadas moléculas que podem ser encontradas e dosadas no sangue. O objetivo desse estudo é investigar a expressão e o papel dessas moléculas, também chamadas de microRNAs, em tumores de cabeça e pescoço.

2. O QUE É NECESSÁRIO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO?

Serão coletados 20 mL de sangue do paciente para estudo de pequenas seqüências chamadas de microRNAs.

3. EXISTE ALGUM RISCO ESPERADO?

Os desconfortos envolvidos na coleta de sangue são mínimos e incluem dor local, sangramento, hematoma e infecção, entretanto, raramente são apresentados..

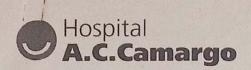
4. QUAIS OS BENEFÍCIOS PREVISTOS?

Uma vez identificado a expressão dessas seqüências e caso identificada diferença nesse perfil quando compararmos casos esporádicos e familiares, poderemos nos utilizar dessa descoberta para as mais variadas formas de atuação, desde o estudo de drogas que possam atuar nas vias sinalizadoras dessas moléculas até a identificação de possíveis fatores prognósticos, além da possibilidade de aconselhamento genético caso identifiquemos uma relação positiva entre a expressão dessas moléculas e a existência de história familiar positiva para o câncer de cabeça e pescoço.

5. FUI ESCLARECIDO SOBRE A GARANTIA DE RECEBER RESPOSTA A QUALQUEI
PERGUNTA OU ESCLARECIMENTO, A CERCA DOS PROCEDIMENTOS, RISCOS
BENEFÍCIOS E OUTROS ASSUNTOS RELACIONADOS COM A PESQUISA?
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
() SIM () NÃO
()
6. FUI ESCLARECIDO SOBRE A LIBERDADE DE RETIRAR MEU CONSENTIMENTO A
QUALQUER MOMENTO SEM QUE ISSO TRAGA PREJUÍZO QUANTO À CONTINUIDADI
DO MEU TRATAMENTO?
() SIM () NÃO
() 1.1.10

7. FUI ESCLARECIDO DE QUE NÃO HAVERÁ REMUNERAÇÃO FINANCEIRA ALÉM DO PREVISTOPARA AS DESPESAS DO ESTUDO?
() SIM () NÃO
8. FUI ESCLARECIDO DE QUE NÃO HAVERÁ INDENIZAÇÃO ALÉM DAS PREVISTAS POR LEI, EM REPARAÇÃO A DANOS IMEDIATOS OU TARDIOS, CAUSADOS PELA PESQUISA EM QUESTÃO?
() SIM () NÃO
9. FUI ESCLARECIDO SOBRE A SEGURANÇA DE QUE MINHA IDENTIDADE SERÁ PRESERVADA, MANTENDO-SE TODAS AS INFORMAÇÕES EM CARÁTER CONFIDENCIAL?
() SIM () NÃO
10. FUI ESCLARECIDO SOBRE A INEXISTÊNCIA DE BENEFÍCIOS DIRETOS DECORRENTES DA PESQUISA?
() SIM () NÃO
IV. INFORMAÇÕES SOBRE O PESQUISADOR: Pesquisador responsável pelo acompanhamento da pesquisa: Thiago Celestino Chulam
Qualquer dúvida referente à pesquisa ou a qualquer um de seus procedimentos, entrar em contato com o pesquisador responsável: 2189-5000 (ramal 5125)
"Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo – SP, pelo Telefone 2189-5020";
V. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES : O(a) senhor(a) receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.
VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa
São Paulo, de de .
assinatura do sujeito da pesquisa assinatura do pesquisador ou responsável legal (carimbo ou nome legível)

Anexo 6 - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa - CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 04 de Maio de 2009.

Ao Dr. Luiz Paulo Kowalski

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1200/09
"MicroRNAs em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente — Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 28/04/2009, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 17/02/2009, aprovaram a realização do estudo em referência datado de 19 de Novembro de 2008, do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, do Questionário Epidemiológico Pré-operatório e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- > Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções CNS;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações;
- Declaração sobre o plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- ➤ Declaração sobre uso e destino do material biológico, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
 - Orçamento financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
 - > Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 6 meses.

Atenciosamente,

Dr. Alexandre Sá de Andrade 2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa