

**IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS MOLECULARES
PREDITORAS DE RESPOSTA À QUIMIO E RADIOTERAPIA
COMBINADA EM TUMORES LOCALMENTE AVANÇADOS DE
LARINGE E HIPOFARINGE**

BIANCA DIANA BARRETO

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis
Co-Orientador: Dr. Alex Fiorini Carvalho**

**São Paulo
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Barreto, Bianca Diana

**Identificação de assinaturas moleculares preditoras de resposta à
quimio e radioterapia combinada em tumores localmente avançados
de laringe e hipofaringe / Bianca Diana Barreto-- São Paulo, 2005.**

101p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. CANCER DA LARINGE. 2. CANCER HIPOFARINGEO. 3.
ANALISE MICROARRAY. 4. PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA. 5.
QUIMIOTERAPIA. 6. RADIOTERAPIA.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
pela formação, valores e princípios que me ensinaram,
pelo carinho e apoio constantes*

*Ao Sergio, pelo seu grande amor e amizade,
por ser tão especial e acreditar em mim.*

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Comenadora Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Luiz Fernando, pela orientação, confiança em mim e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Alex, por todas as ajudas e calma que me passa quando há problemas.

Ao médico Luiz Paulo Kowalski, pelos ensinamentos clínicos e idéias que contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital, em especial ao médico Olavo e à estatística Inês.

Às amigas que o mestrado me trouxe e momentos de diversão e alegria, aos meus amigos Ana Helena, Ana Coló, Bia, Nair e Vladimir.

À Ana Helena, Bia, Nair e Patrícia, por tornarem os momentos de almoço muito bons.

À Luciana, pelas conversas, ajudas e amizade.

À Regina, pela amizade.

À Waleska, pelas ajudas e dicas.

À secretária Aline, pela simpatia e presteza.

À Adriana, pela ajuda com a dissertação.

À todos do LABRI, Bárbara, Sibebe, Suzana, Abrantes, Cham, Graziela, Lara, Mari Santos, Mari Marques, Sarah, Gisele, Cíntia e Isabela. Cada um contribui da sua forma, e de modo muito importante, para este trabalho se realizar.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital, especialmente o Dr. Fernando Soares, pelas análises das lâminas.

Aos funcionários do SAME, pelos prontuários.

Ao Carlos, Severino e Miyuki, pelas lâminas histológicas.

Ao Laboratório de Biologia Computacional, em especial à Dra. Helena, Luiz Paulo e Daniel, pelas análises.

Aos matemáticos Hirata, Jordão, Gustavo e Elier, pelas análises e pela paciência de ensinar a “matemática além do alcance”.

À Oz informática, pela ajuda em todos os momentos de desespero com o computador.

Aos integrantes da Banca de Qualificação, pelas críticas construtivas.

Ao Dr. Brentani, pela brilhante direção do Instituto Ludwig e do Hospital do Câncer.

Às bibliotecárias do Hospital do Câncer.

Ao Departamento de Pós-Graduação, Ana Maria e Márcia.

Aos funcionários do Ludwig e do Hospital do Câncer.

À Ana Paula, Nancy, Olívia e Giovana, pela grande amizade.

Aos meus familiares, em especial meus avós, meus pais, Júlia e Percival, e meu irmão Fábio, por tantas coisas..., por tudo.

Ao Sergio, meu melhor amigo, pelas ajudas, incentivo, confiança e amor.

À Fundação Antônio Prudente e Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, instituições de excelência, pela possibilidade de realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo suporte financeiro e credibilidade.

RESUMO

Barreto BD. **Identificação de assinaturas moleculares preditoras de resposta à quimio e radioterapia combinada em tumores localmente avançado de laringe e hipofaringe.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A combinação de quimio e radioterapia se tornam o tratamento de escolha para o tratamento de carcinoma epidermóide localmente avançado de laringe e hipofaringe, com sobrevida livre de doença similar às taxas obtidas com laringectomia total e radioterapia pós-operatória. Entretanto, pacientes não-respondedores sofrem freqüentemente de toxicidade, atraso na cirurgia e riscos de complicações. Além disso, existe um aumento significativo no custo do tratamento. Um total de 43 pacientes com carcinoma epidermóide localmente avançado de laringe e hipofaringe foram selecionados para um ensaio clínico fase II com paclitaxel (30mg/m^2) e cisplatina (20mg/m^2) ministrados semanalmente concomitante com radioterapia na dose de 7040cGy em frações de $180\text{cGy}/\text{dia}$. Previamente ao tratamento foram coletadas biópsias de cada paciente e armazenadas em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído pelo método do Trizol, RNAm foi amplificado e 35 amostras foram hibridizadas em microarray de 4.800 genes. Ferramentas matemáticas e estatísticas foram empregadas a fim de identificar assinaturas moleculares que poderiam prever a resposta terapêutica. O seguimento clínico dos pacientes foi feito por 3 a 5 anos. O tratamento com cisplatina e paclitaxel concomitante à radioterapia apresentou resposta completa (R) em 60% dos pacientes. A resposta completa foi associada com melhora significativa das taxas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global. Foram identificados 4 trios e 27 quadras de genes cujos perfis de expressão predizem precisamente os pacientes respondedores. Utilizando-se análise do tipo validação cruzada (CV) todos os trios e quadras foram capazes de reproduzir a classificação das amostras com 100% de precisão. Finalmente, identificamos alteração de correlação na expressão de genes agrupados por vias metabólicas quando amostras de pacientes respondedores e não respondedores foram

comparados. Essas análises poderão, no futuro, contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares relevantes para o sucesso ao tratamento proposto. Nossos dados demonstram que os classificadores aqui descritos podem ser empregados aos pacientes previamente ao tratamento a fim de selecionar pacientes para a quimiorradioterapia ou tratamento cirúrgico de carcinoma epidermóide localmente avançado de laringe e hipofaringe.

SUMMARY

Barreto BD. **[Identification of molecular predictors of response to chemoradiotherapy in locally advanced larynx and hypopharynx tumors]**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The combination of chemotherapy and radiotherapy became the gold standard for treatment of locally advanced SCC of the larynx and hypopharynx, with disease-free survival similar to the rates obtained with total laryngectomy and postoperative radiotherapy. However, non-responders suffer badly from toxicity, delay in surgery and risk of complications. Furthermore, there is a significant increase in the cost of the treatment. A total of 43 patients with locally advanced laryngeal and hypolaryngeal SCC were selected for a phase II study of weekly paclitaxel (30mg/m²) and cisplatin (20mg/m²) with concurrent radiotherapy of 7040cGy in 180cGy/day fractions. Prior to treatment, a biopsy sample from every patient was obtained and stored in liquid nitrogen. Total RNA was extracted by Trizol, mRNA was amplified and 35 samples were hybridized against a microarray with 4.800 features. Statistical and mathematical tools were employed for the identification of molecular signatures that could be predictors of therapeutic response. Patients were followed-up from 3 to 5 years. Concurrent treatment with paclitaxel and cisplatin plus radiotherapy lead to completed response (CR) in 60% of patients. CR was associated with a significant improvement in disease-free survival and overall survival rates. We identified 4 trios and 27 quartets of genes that could precisely predict responsiveness. After using a cross validation analysis (leave-one out analysis) all trios and quartets were able to reproduce the classification of the samples with 100% precision. Finally, we identified correlation alteration in the expression of genes grouped together according to metabolic pathways when samples of responders and non-responders were compared. In the future, these analyses might contribute to the understanding of the molecular mechanisms relevant to the success of the proposed treatment. Our data demonstrate that the molecular classifiers described herein could be applied to patients prior to treatment in order to

select patients for chemoradiotherapy or surgical treatment of locally advanced SCC of larynx or hypopharynx.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da amplificação de RNA.....	29
Figura 2	Curva de sobrevida global.....	45
Figura 3	Curva de sobrevida livre de doença.....	46
Figura 4	Avaliação da integridade dos RNAs extraídos de amostras tumorais.....	47
Figura 5	Avaliação da integridade dos RNAs extraídos de amostras normais.....	47
Figura 6	Avaliação da integridade dos RNAs amplificados.....	49
Figura 7	Avaliação da qualidade de marcação do cDNA.....	50
Figura 8	Lâmina hibridizada.....	51
Figura 9	Quantificação de lâmina.....	51
Figura 10	Gráficos MM “plot”.....	55
Figura 11	Cluster hierárquico.....	56
Figura 12	Separação entre amostras respondedoras e não respondedoras por classificadores moleculares.....	62
Figura 13	Matriz de correlação entre pares de genes da via de apoptose dos pacientes respondedores.....	64
Figura 14	Matriz de correlação entre pares de genes da via de apoptose dos pacientes não respondedores.....	65

Figura 15 Matriz de diferença de correlação entre pares de genes da via de apoptose.....	66
Figura 16 Matriz de correlação entre pares de genes da via do ciclo celular dos pacientes respondedores.....	67
Figura 17 Matriz de correlação entre pares de genes da via do ciclo celular dos pacientes não respondedores.....	68
Figura 18 Matriz de diferença de correlação entre pares de genes da via do ciclo celular.....	69
Figura 19 Agrupamento das amostras de acordo com o perfil de expressão de 34 genes da via de apoptose.....	70
Figura 20 Agrupamento das amostras de acordo com o perfil de expressão de 39 genes da via do ciclo celular.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sítio de doença e classificação dos pacientes.....	42
Tabela 2	Características clinicopatológicas dos pacientes.....	43
Tabela 3	Cem genes mais diferencialmente expressos.....	57
Tabela 4	Trios de genes.....	60
Tabela 5	Quadras de genes.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

aRNA	RNA amplificado
BSA	albumina sérica bovina
CCD	“charge-coupled device”
cDNA	DNA complementar
cDNA arrays	arranjos de cDNA
CE	carcinoma epidermóide
cGy	centigray
ch	“channel”
CV	validação cruzada
Cy	“cyanine”
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESTs	“expressed sequence tags”
HPV	“human papillomavirus”
IC	intervalo de confiança
KEGG	“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
Km	K- Médias
KNN	“K nearest neighbours” ou K-vizinhos
m	metro
mg	miligrama
mRNA	RNA mensageiro
NR	não respondedor
nm	nanômetro
ORESTES	“open reading frame ESTs”
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PoliA	cauda poli(A) do mRNA

R	respondedor
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa
S	coeficiente de sedimentação, unidade de Svedberg
SCC	“squamous cell carcinomas”
SDS	lauril sulfato de sódio
SOM	“self-organizing maps”
SSC	solução salina com citrato de sódio
SVD	“singular value decomposition”
SVM	“support vector machine”
TAE	solução de Tris, acetato e EDTA
3D	3 dimensões
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TS	“template switching”
UV	ultravioleta
V	volts
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer.....	1
1.2	Estruturas Laríngea e Hipofaríngea e sua Função.....	3
1.3	Câncer de Laringe e Hipofaringe.....	5
1.4	Tratamento do Câncer de Laringe e Hipofaringe.....	6
1.5	Fatores de Risco.....	10
1.6	Marcadores Moleculares.....	13
1.7	Análise da Expressão Gênica em Larga Escala.....	15
1.8	cDNA Microarrays.....	16
1.9	Utilização de cDNA Microarray no Câncer.....	18
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos Específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Coleta de Amostras.....	24
4.2	Desenho Experimental e RNA Referência.....	25
4.3	Confirmação do Diagnóstico Histológico e Semi-Microdissecção.....	26
4.4	Extração do RNA total das Amostras e do RNA Referência.....	27
4.5	Avaliação da Integridade dos RNAs.....	27
4.6	Amplificação do RNA Mensageiro das amostras Tumorais e do RNA Referência.....	28
4.7	Marcação do cDNA.....	30
4.8	Confecção das Lâminas de cDNA Microarray.....	31
4.9	Pré-Hibridização e Hibridização em Lâmina de Vidro.....	32
4.10	Digitalização das Imagens.....	33

4.11	Quantificação dos Dados.....	33
4.12	Análises Matemáticas e Estatísticas.....	34
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Seguimento Clínico dos Pacientes.....	40
5.2	Avaliação da Integridade do RNA Extraído.....	46
5.3	Amplificação.....	48
5.4	Hibridização, Digitalização das Imagens e Quantificação dos Dados.....	49
5.5	Análises Matemáticas e Estatísticas.....	52
6	DISCUSSÃO.....	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER

Foram previstos 1.368.030 novos casos de câncer ou tumor maligno e 563.700 mortes nos Estados Unidos da América, apenas em 2004. Uma em cada 4 mortes nos EUA é devido ao câncer, sendo este o responsável pelo segundo maior número de mortes entre adultos e crianças de 1-14 anos. Além disso, o câncer é ainda a primeira causa de mortes em mulheres entre 40-79 e em homens entre 60-79 anos nos EUA (JEMAL et al. 2004).

No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte por doença, representando um grave problema de saúde pública (Ministério da Saúde 2005). Esta doença causa grandes perdas para a sociedade, além de um efeito devastador nos pacientes e seus familiares; e os custos econômicos do câncer são enormes, tanto em termos de cuidados médicos para o tratamento quanto em perdas humanas devido à mortalidade precoce (ETZIONI et al. 2003).

Cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula que lhe dão origem, assim, os que se originam de células epiteliais são chamados de carcinomas e aqueles que se originam de tecidos conjuntivos ou musculares são denominados de sarcomas. Existem ainda os cânceres que não se enquadram nestas duas categorias e incluem os vários tipos de leucemias, derivadas de células hematopoiéticas e cânceres derivados do sistema nervoso (ALBERTS et al. 1994).

Geralmente tumores benignos são bem diferenciados, enquanto que os malignos podem ser tanto diferenciados quanto indiferenciados (anaplásicos). A taxa de crescimento dos tumores normalmente correlaciona-se inversamente com seu nível de diferenciação; tumores malignos crescem mais rapidamente que os benignos (COTRAN et al. 1999).

Acredita-se que o genótipo de células cancerosas resulta de uma manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular: auto-suficiência de estímulos de crescimento, insensibilidade a estímulos inibitórios de crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação infinito, angiogênese prolongada e invasão de tecidos e metástase (HANAHAN e WEINBERG 2000).

A auto suficiência de sinais de crescimento permite às células tumorais reduzirem a dependência de estímulos do seu microambiente de células normais, por isso acredita-se que as vias de sinalização de crescimento estejam desreguladas em todos os tumores humanos. Adquirir resistência à apoptose (morte celular programada) é uma característica de provavelmente todos os tipos de cânceres, e existem diversas estratégias para fazê-lo. As células humanas intrinsecamente apresentam limites na sua multiplicação, mas nas células cancerígenas a via que controla o potencial de replicação parece agir de modo independente das outras vias metabólicas. Neovascularização é um pré-requisito para a rápida expansão clonal (monoclonal) necessária para a formação do tumor macroscópico, desta forma, pretende-se provar que a indução da angiogênese é um evento que ocorre entre o início e a metade do surgimento do câncer. A metástase é o principal evento responsável por transformar um tumor em maligno, e envolve mudanças na adesão

entre as células no seu microambiente e a ativação de proteases extracelulares (HANAHAN e WEINBERG 2000).

Essas seis características novas adquiridas devem ocorrer na maioria e talvez em todos os tipos de tumores humanos, deste modo, essa multiplicidade de eventos explica porque o câncer é um evento relativamente raro durante a vida humana (HANAHAN e WEINBERG 2000).

1.2 ESTRUTURAS LARÍNGEA E HIPOFARÍNGEA E SUA IMPORTÂNCIA

A laringe humana é um órgão altamente especializado. Nos animais primitivos a laringe era um pouco mais que um esfíncter para proteger o trato respiratório inferior da inalação de substâncias nocivas e corpos estranhos, mas durante o processo evolutivo ela assumiu a função da fonação (BENJAMIN et al. 1996).

Este órgão apresenta um arcabouço protetor osteocartilaginoso e membranoso que inclui o osso hióide e as cartilagens epiglótica, tireóide e cricóide. Este arcabouço, em conjunto com o par de cartilagens aritenóideas e as pequenas cartilagens corniculadas e cuneiformes, está inteiramente conectado por uma série de membranas e ligamentos. O par de cartilagens aritenóideas em forma de pirâmides se articula com a superfície articular superior das lâminas posteriores das cartilagens cricóide. Esta articulação sinovial é vital para vários movimentos complexos das pregas vocais, incluindo a abdução e a adução durante a respiração e as variações de tensão e massa das pregas vocais durante a fonação. Os músculos intrínsecos da

laringe são inervados pelo nervo laríngeo recorrente que comanda as funções da respiração, fonação, deglutição e fechamento da laringe (BENJAMIN et al. 1996).

A laringe pode ser dividida em 3 regiões, sendo estas a laringe **supraglótica**, que compreende a epiglote, falsas cordas, ventrículos, pregas ariepiglóticas e aritenóides; a **glote**, que são as cordas vocais verdadeiras e comissuras anterior e posterior; e ainda a **subglote**, que se inicia 1 cm abaixo das cordas vocais verdadeiras e se estende até o primeiro anel traqueal (BENJAMIN et al. 1996). A maioria dos tumores de laringe, aproximadamente 66%, acometem a glote (PARKIN et al. 1990).

A drenagem linfática da região supraglótica é rica e assim, tumores nessa localização apresentam altos índices de metástases linfáticas regionais, entre 50-60%, e frequentemente apresentam incidência bilateral. Ao contrário, os tumores glóticos apresentam uma baixa incidência de metástases linfáticas cervicais e quando ocorrem geralmente são ipsilaterais. As metástases linfáticas de tumores subglóticos são mais frequentes e envolvem preferencialmente as cadeias paratraqueais, cervicais baixas e mediastinais altas (LINDBERG 1972; BYERS et al. 1988; MATOS DE SÁ 1997).

A hipofaringe é uma das divisões da faringe e também é denominada de laringo-faringe, a região mais inferior da faringe. A hipofaringe pode ser delimitada pela prega faringoepiglótica e pela prega cricofaríngea, sendo um importante canal na passagem do alimento (BARBOSA 1979).

A hipofaringe pode ser dividida em **seios piriformes**, localizados um de cada lado do estójo laríngeo; e em **porção inter-crico-vertebral** ou **retrocricóide**, disposta entre a face posterior da cricóide, para diante, e o plano vertebral, para traz. Os seios piriformes são sedes preferenciais dos tumores, sendo o sítio acometido em 80-90% dos casos (BARBOSA 1979).

Esta região apresenta ampla e rica distribuição linfática, o que gera elevadíssima incidência de metástases desses tumores; além disso, esses tumores costumam exibir menor grau de diferenciação que os da laringe (BARBOSA 1979). Normalmente, quanto menor o grau de diferenciação de um tumor maior é sua malignidade.

Os sintomas são indicativos da localização da lesão, sendo que odinofagia sugere tumor supraglótico e rouquidão indica tumor glótico e subglótico. O câncer supraglótico geralmente é acompanhado de outros sinais e sintomas, como alteração na qualidade da voz, disfagia leve e sensação de um “caroço” na garganta. Nas lesões avançadas das cordas vocais, além da rouquidão, pode ocorrer odinofagia, disfagia e dispnéia.

1.3 CÂNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE

JEMAL et al. (2004) estimaram que nos Estados Unidos da América, em 2004, 18.520 indivíduos apresentaram novos casos de câncer de laringe e faringe sendo que 77,7% destes pertencem ao sexo masculino, levando 5.900 indivíduos a óbito.

Os tumores malignos de Cabeça e Pescoço estão entre as formas de câncer com maior incidência na população brasileira, totalizando 10.463 indivíduos com câncer de laringe e hipofaringe, sendo 88,5% pertencentes ao gênero masculino e 6.288 foram a óbito, em 2002 (GLOBOCAN 2002). Em todo o mundo 289.537 indivíduos apresentaram câncer de laringe e hipofaringe sendo que destes, 84,7%

pertenciam ao gênero masculino, matando 173.949 indivíduos, apenas no ano de 2002 (GLOBOCAN 2002).

O Brasil é um país que apresenta as maiores incidências desta neoplasia maligna e este fato está, provavelmente, relacionado à alta frequência de tabagismo e etilismo, que são considerados os principais fatores de risco (GOLDENBERG et al. 2003) na nossa comunidade.

O câncer de laringe é um dos mais comuns a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área e 2% de todas as doenças malignas.

A relação de incidência por sexo é aproximadamente 7:1 (masculino: feminino), a maior diferença em comparação com qualquer outro sítio anatômico do corpo humano, e a maior incidência ocorre entre a sexta e sétima décadas de vida (Ministério da Saúde 2005).

Aproximadamente 90% dos cânceres de laringe e hipofaringe apresentam origem epitelial, essas células são encontradas no tecido que forma a superfície da pele, o revestimento dos órgãos ocos e as passagens dos tratos respiratório e digestivo. Assim, o tipo predominante é carcinoma epidermóide (ou carcinoma de células escamosas), incluindo os ceratinizantes e não-ceratinizantes, de graus bem, moderadamente ou pouco diferenciados. Os adenocarcinomas de origem salivar menor, os tumores neuroendócrinos, os mesenquimais e os melanomas também podem ser encontrados, porém em padrão infrequente (OLIVEIRA et al. 1997).

1.4 TRATAMENTO DO CÂNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE

O tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço pode causar problemas nos dentes, fala e deglutição. Assim, quanto mais precoce for o diagnóstico, menor é a possibilidade do tratamento causar deformidades e problemas psico-sociais. Em consequência da laringectomia 30% dos pacientes passam a ter fala esofágica incompreensível, o que faz com que aproximadamente 50% fiquem reclusos em suas residências, perdendo assim seus empregos e se retirando do convívio social (Ministério da Saúde 2005).

O tratamento convencional para os carcinomas epidermóides de laringe e hipofaringe consiste, basicamente, na utilização de modalidades de tratamento locorregionais, cirurgia e radioterapia. Em pacientes com tumores em estádios precoces (ECI e II) esta abordagem terapêutica tem resultado no controle local da doença em 70- 95% dos casos, com uma sobrevida de cinco anos em 60% dos casos de tumores de laringe (VERMUND 1970; FLETCHER et al. 1975; WANG et al. 1986; MENDENHALL et al. 1990 e 1996) e de 40% a 60% dos casos para os tumores de hipofaringe (SHAH et al. 1976; VANDENBROUCK et al. 1987; MENDENHALL et al. 1987).

No entanto, a taxa de resposta objetiva ao tratamento cai significativamente em tumores mais avançados de laringe e hipofaringe (SHAH et al. 1976; HARWOOD et al. 1979; BATAINI et al. 1982; KEANE et al. 1983; MENDENHALL et al. 1987) e requerem cirurgias com grandes ressecções teciduais as quais levam, inevitavelmente, a um importante comprometimento funcional e estético. Frequentemente, o tratamento cirúrgico dos tumores avançados de laringe e

hipofaringe requerem a laringectomia ou laringofaringectomia totais, associadas a um amplo esvaziamento cervical para o controle local do tumor primário. A conseqüente perda da fala e o uso permanente de traqueostoma é considerado um prejuízo funcional grave que afeta dramaticamente a qualidade de vida (WEYMULLER et al. 2000; HANNA et al. 2004; VARTANIAN et al. 2004).

Recentemente, a adoção de um regime quimioterápico associado à radioterapia tem mostrado resultados promissores melhorando a sobrevida global (BATAINI et al. 1982; PIGNON et al. 2000), tanto na forma de tratamento adjuvante para pacientes de alto risco (VERMUND, 1970; VANDENBROUCK et al. 1987) quanto na forma de tratamento neoadjuvante, numa estratégia para preservação de órgãos (MENDENHALL et al. 1987).

Foi realizado um ensaio clínico por FORASTIERE et al. (2003) com cisplatina ministrada concomitantemente com radioterapia, demonstrando melhora significativa na preservação de órgãos quando comparada à quimioterapia neoadjuvante seguida de radiação ou radioterapia isolada. Em carcinomas epidermóides avançados de cabeça e pescoço quimio-radioterapia com paclitaxel apenas ou combinado com cisplatina demonstrou levar a melhora significativa nas taxas de resposta quando comparadas à radioterapia isolada (FORASTIERE et al. 2001; GARDEN et al. 2004).

Embora a droga de escolha para a quimioterapia associada à radioterapia seja a Cisplatina, estudos recentes têm demonstrado resultados promissores com a utilização do Paclitaxel, para o tratamento de formas avançadas de carcinoma epidermóide (ROWINSKY et al. 1992; ROSE 1992; KEARNS et al. 1995). Cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina II) é um complexo inorgânico divalente

hidrossolúvel que contém platina. Existem mais de 1.000 compostos deste tipo, mas a cisplatina foi a mais ativa dessas substâncias em sistemas tumorais experimentais e mostrou-se de grande valor clínico (ROSENBERG 1973). A cisplatina é um agente antineoplásico alquilante de bases nitrogenadas que entra na célula por difusão, reage com o DNA e forma principalmente ligações cruzadas intrafilamentares entre guaninas adjacentes, levando à inibição da replicação e transcrição do DNA (GILMAN et al. 1996).

A cisplatina apresenta ampla atividade como agente antineoplásico e é especialmente útil no tratamento de malignidades epiteliais. Este fármaco se tornou a base de esquemas curativos para câncer testicular avançado e tem notável atividade contra câncer ovariano e cânceres da cabeça e pescoço, bexiga, esôfago e pulmão.

Paclitaxel é uma droga que foi aprovada para tratamento de câncer ovariano refratário à cisplatina em 1992 (ROWINSKY et al. 1993; ROWINSKY e DONEHOWER 1995) e apresenta atividade promissora contra cânceres de cabeça e pescoço, mama, pulmão, esôfago e sarcoma de Kaposi, apresentando taxas significativas de resposta.

Paclitaxel (taxol) é um fármaco que apresenta atividade antineoplásica e que exibe ações farmacológicas únicas como inibidor da mitose. Seu mecanismo de ação se baseia em sua interação com os microtúbulos, especificamente à subunidade β da tubulina, impedindo a desmontagem dos microtúbulos, evento essencial para a continuidade do processo mitótico, levando à interrupção da mitose e posterior morte celular (GILMAN et al. 1996).

1.5 FATORES DE RISCO

A etiologia do câncer de cabeça e pescoço é multifatorial (MAIER et al. 1992), sendo de extrema relevância estudar fatores de risco ambiental e a expressão gênica diferencial.

Em decorrência de inúmeros estudos existe forte associação entre ingestão excessiva de álcool e tabagismo com o desenvolvimento de câncer nas vias aerodigestivas superiores, sendo o tabagismo o maior fator de risco para o desenvolvimento de câncer na laringe e hipofaringe. Quando a ingestão excessiva de álcool é adicionada ao tabagismo, o risco desse tipo de câncer aumenta. Pacientes com câncer de laringe que continuam a fazer uso de cigarro e bebida têm probabilidade de cura diminuída e aumento do risco de aparecimento de um segundo tumor primário na região da cabeça e pescoço (Ministério da Saúde 2005).

MAIER et al. (1992) concluíram em seus estudos que o uso de álcool e tabaco aumentam o risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide de laringe, de modo dose-dependente; e ainda que o uso combinado resulta em efeito sinérgico, aumentando o risco de modo multiplicativo, e não apenas aditivo.

O risco de câncer associado ao tabaco tem sido explicado pelo fato de sua fumaça conter mais de 30 compostos carcinogênicos diferentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e nitrosaminas tabaco-específicas, algumas sendo capazes de ação carcinogênica local (HOFFMANN et al. 1985).

Além disso, o consumo crônico de etanol aumenta a atividade de enzimas procarcinogênicas (GARRO et al. 1981; FARINATI et al. 1985) além de afetar a carcinogênese através da inibição do reparo de DNA (MUFTI et al. 1981). A

administração aguda e crônica de etanol também diminui a produção e secreção salivar (KISSIN e KALEY 1974; MAIER et al. 1986 e 1988), o que resulta em maior concentração local de procarcinógenos e carcinógenos, prejudicando a superfície mucosa da cavidade oral (MAIER et al. 1992).

Foi realizado um estudo no Brasil, por SCHLECHT et al. (2001), que tinha por objetivo investigar os efeitos do consumo de etanol relacionado ao risco elevado de desenvolvimento de carcinoma na laringe e faringe. Através de regressão logística foi calculado o risco relativo de câncer para diferentes tipos de bebidas, e tanto para laringe como faringe a cachaça demonstrou ser a bebida causadora de maior risco relativo e ainda apresentou relação dose-dependente. A cachaça contém concentrações bem mais altas de etanol (50%) do que a cerveja (5%) e o vinho (10%).

Existem estudos que demonstram que o etanol é o principal agente carcinogênico em bebidas alcoólicas, tanto por causar a queima direta do epitélio (HSU 1992) como por produzir acetaldeído através da reação do etanol com a saliva (TILLONEN et al. 1999).

Foram realizados também estudos que demonstraram que o consumo do mate, conhecido como chimarrão no Brasil, erva da árvore *Ilex paraguariensis*, espécie da família Aquifoliaceae, é carcinogênico e aumenta a taxa de desenvolvimento de câncer na laringe e faringe em 2,1 vezes (GOLDENBERG et al. 2003).

Demonstrou-se ainda que indivíduos que fazem utilização de tabaco e bebem chimarrão apresentam um risco multiplicado de desenvolver câncer na laringe, e resultados similares foram encontrados para o uso combinado de etanol e chimarrão

(DE STEFANI et al. 1987). Este fato torna-se importante uma vez que a incidência de câncer na laringe em indivíduos do sexo masculino no Brasil está entre as maiores do mundo (MUIR e WEILAND 1995).

O mate pode agir como solvente dos carcinógenos químicos encontrados no tabaco, além disso, os compostos fenólicos encontrados no mate podem agir como promotores do câncer. Soma-se a isto o fato do mate conter taninos e compostos N-nitrosos, que também são suspeitos de serem carcinógenos (GOLDENBERG et al. 2003). Foram também encontradas substâncias na fração de óleo do mate, que se mostraram carcinogênicas em animais de laboratório (VASSALLO et al. 1985). Outros estudos ainda concluíram que o mate é genotóxico, causando mutagênese em bactérias e aumentando a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos humanos tratados com mate (FONSECA et al. 2000).

LÖNING et al. (1985) foram o primeiro grupo de pesquisadores a sugerir uma relação entre papilomavírus humano (HPV) e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, em 1985, e desde então evidências desta possível associação têm aumentado. Os HPVs 16, 18 e 33, também conhecidos como HPVs de alto risco, produzem proteínas oncogênicas, E6 e E7, que se ligam e inativam p53 e pRb, respectivamente, que são importantes proteínas supressoras de tumor; promovendo a imortalização celular, desregulação do ciclo celular e apoptose (ZUR HAUSEN 2000; VAN HOUTEN et al. 2001).

Outro estudo foi realizado por RINGSTRÖM et al. (2002), com pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço dos quais 20% apresentaram HPV 16. Os pacientes HPV positivos eram mais jovens, consumiam

menos álcool e apresentavam melhor estado e resposta clínica em relação aos HPV negativos; o que sugere um processo distinto de doença nesses pacientes.

Os dados mostram que 15-20% dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HOFFMAN et al. 1998) não apresentaram exposição ao tabaco nem ao álcool (GILLISON e SHAH 2001). Este grupo pode estar crescendo (MYERS et al. 2000) e apresenta uma grande porcentagem de adultos jovens e mulheres (MENDEZ et al. 1985; KOCH et al. 1999; VERSCHUUR et al. 1999).

VAN HOUTEN et al. (2001) também demonstraram que HPV do tipo 16 são, de fato, responsáveis por uma parcela de carcinoma epidermóide na hipofaringe.

1.6 MARCADORES MOLECULARES

Todo tratamento oncológico conservador que não leve a 100% de eficácia, corre-se o risco de, nos pacientes não respondedores, ocorrer um avanço da doença o que, inevitavelmente, irá diminuir as chances de sobrevida do paciente. Neste sentido, vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de identificação de marcadores moleculares que possam diferenciar, a priori, os pacientes respondedores dos não respondedores.

A resistência à radioterapia é determinada por múltiplos eventos celulares que são controlados por um grande grupo de genes e suas interações, deste modo, os arrays de cDNA surgem como ótimas ferramentas para tal comparação (HANNA et al. 2001).

Desta forma, inúmeros estudos vem sendo desenvolvidos buscando descobrir marcadores que diferenciem pacientes respondedores dos não respondedores, tanto

em relação à radioterapia quanto à quimioterapia. Esta descoberta é muito importante uma vez que a predição da resposta do paciente irá facilitar a escolha do tratamento adequado.

A superexpressão de p53 mutado foi detectada em aproximadamente 60% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (FIELD et al. 1993b) e também foi correlacionada com uma pobre resposta à radioterapia nesses cânceres (FIELD et al. 1993a).

Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço frequentemente geram metástases para linfonodos regionais, assim, MAULA et al. (2003) estudaram a expressão de moléculas de adesão das células de carcinoma de cabeça e pescoço, e concluíram que a expressão de CD44 estava associada com prognóstico ruim, com risco aumentado de recorrências locais e com maior resistência à radioterapia; ou seja, os níveis de CD44 das células tumorais podem predizer a sensibilidade à radioterapia.

HANNA et al. (2001) realizaram um estudo através de cDNA array para analisar o perfil de expressão de 1.187 genes, incluindo oncogenes, genes supressores de tumor, genes do ciclo celular e genes relacionados com apoptose, em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço resistentes e sensíveis à radioterapia. Como resultado foram encontrados 60 genes preditores de resposta à radioterapia.

Outros estudos ainda demonstraram que, pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que expressam p53 mutada e com baixa taxa de proliferação celular apresentam enorme probabilidade de não responderem à radioterapia; enquanto que a expressão de p53 do tipo selvagem e alta taxa de

proliferação são excelentes indicativos de resposta ao tratamento radioterápico, até mesmo com doença em estado avançado. Neste mesmo estudo outros possíveis marcadores foram analisados em tumores primários, como HSP-27, c-erb B-2 e GST π , mas nenhuma relação foi encontrada quanto à resposta radioterápica (RAYBAUD-DIOGÈNE et al. 1997).

Até o presente momento, apesar dos estudos, não existem marcadores prognósticos aceitáveis que possam guiar a seleção e o tratamento de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ou que consigam prever a resposta ao tratamento quimioterápico (SHIGA et al. 1999).

Neste sentido, foi realizado ainda um estudo na tentativa de encontrar marcadores de resposta à quimioterapia com Cisplatina/Paclitaxel ou Cisplatina/5-fluorouracil em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Como resultado, nenhum dos possíveis marcadores, p53, GST π , MRP, c-erb B2, TS e GSH-S, foram significativamente correlacionados com resposta clínica à quimioterapia. Apesar disto, a expressão de p53 mutada e a superexpressão de GST π e TS se mostraram bons preditores de menor sobrevida (SHIGA et al. 1999).

1.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA

A análise diferencial da expressão gênica tem sido realizada por diversas metodologias que comparam o conteúdo de mRNA de diferentes células ou tecidos. Dentre estas técnicas podemos citar a hibridização subtrativa (LEE et al. 1991), o DDRT-PCR (RT-PCR por amostragem diferencial) (LIANG e PARDEE 1992), o RAP-PCR fingerprinting (Impressões Digitais por PCR arbitrário de RNA) (WELSH

et al. 1992), o RDA (Análise por Representação Diferencial) (HUBANK e SCHATZ 1994), a técnica SAGE (Análise em Série da Expressão Gênica) (VELCULESCU et al. 1995) e atualmente, a análise global de genes por micro-arranjos de cDNAs (SCHENA et al. 1995; DE RISI et al. 1996).

Mais recentemente, a possibilidade de utilização de técnicas robotizadas permitiram a análise da expressão diferencial, em grande escala, de genes de duas populações celulares. Através do DNA microarray, um grande número de fragmentos de cDNAs podem ser fixados em pequenas superfícies de vidro ou membranas de nylon e os níveis de expressão de milhares de genes podem ser analisados em um único experimento. Esta metodologia permite a análise da expressão funcional de um grande número de genes, mesmo aqueles cujas funções ainda não foram elucidadas, ou que não tiveram sua seqüência completa de nucleotídeos determinada.

1.8 cDNA MICROARRAYS

Embora o primeiro trabalho de microarray denomine o material marcado ou flutuante de sonda, ou “probe”, (SCHENA et al. 1995), a maior parte dos trabalhos subseqüentes consideram sonda os fragmentos fixados e alvo o material marcado (SOUTHERN et al. 1999). Esta nomenclatura baseia-se fundamentalmente no fato de o material fixado apresentar seqüência conhecida, como as sondas utilizadas em experimentos de Southern e Northern blot. Deste modo, nesse trabalho utilizaremos a nomenclatura de sonda como o material fixado em lâmina de vidro e alvo como o flutuante que será marcado fluorescentemente.

Os DNA microarrays, também conhecidos como chips de DNA, são superfícies de vidro ou nylon que contêm milhares de fragmentos de DNA distribuídos em espaços mínimos. Eles são utilizados para determinar a expressão gênica de dezenas de milhares de genes em um único experimento. O DNA fixado ou sonda pode ser hibridizado com um alvo de cDNA derivado de RNA total ou mRNA, marcado com uma substância fluorescente ou radioativa. O microarray pode ser utilizado tanto para monitorar a expressão gênica quanto para detectar polimorfismos ou mutações no DNA genômico. Neste último caso, são utilizados biochips onde oligonucleotídeos são fixados no suporte sólido. Assim é possível, por exemplo, identificar a regulação gênica envolvida na progressão de uma doença, polimorfismos que predisõem a uma determinada doença e desenvolver tratamentos mais efetivos destas doenças.

O formato de biochip em vidro possui vantagens sobre as grandes membranas flexíveis (SOUTHERN 1975; LENNON e LEHRACH 1991), pois reduz a área de difusão necessária para que o cDNA alvo (ou marcado) encontre a sonda (ou cDNA fixado), reduzindo assim o volume de hibridização. Com isso, é necessária uma menor quantidade de RNA das amostras em estudo, tornando possível o estudo de material proveniente de biópsia. Além disso, existe a vantagem da hibridização simultânea utilizando corantes diferentes para a marcação. Os chips podem ser diferentes quanto ao tamanho dos fragmentos de DNA fixados, métodos de arranjo, ligações existentes entre o DNA e o chip, métodos de hibridização e detecção. Os formatos mais conhecidos para os chips são o arranjo de cDNA (SCHENA et al. 1995) e o arranjo de oligonucleotídeos sintetizados “in situ” (PEASE et al. 1994).

Os arranjos de cDNA são feitos através da deposição robótica do DNA em lâmina de vidro em pontos com diâmetro entre 50-150 μm . Geralmente são utilizados produtos amplificados de clones de cDNA. Esta tecnologia permite a comparação entre duas populações distintas de cDNA marcadas com substâncias fluorescentes de duas cores distintas. As duas sondas podem ser hibridizadas em um único chip e a detecção do sinal é feita separadamente para cada cor.

1.9 UTILIZAÇÃO DE cDNA MICROARRAY NO CÂNCER

A metodologia de cDNA Microarray tem gerado uma enorme quantidade de informação em estudos relacionados ao câncer, com o objetivo de identificar tanto genes potencialmente envolvidos no processo de transformação maligna quanto para aplicação clínica, quer seja no diagnóstico ou no prognóstico (LAKHANI et al. 2001). A utilização de cDNA microarrays em análises comparativas de expressão gênica tem crescido muito nos últimos anos. Sua capacidade de estudar milhares de genes simultaneamente tem justificado o abandono de técnicas de menor escala, especialmente em situações nas quais as células ou os tecidos comparados são bastante semelhantes.

A técnica de DNA arrays (SCHENA et al. 1995) permite a análise da expressão de centenas a milhares de genes em um único ensaio, e o resultado combinado de experimentos distintos permite o estabelecimento de perfis gênicos para cada condição patológica, identificando genes sub ou superexpressos (QUACKENBUSH 2001). Além disso, o agrupamento de genes em classes de

expressão fornece pistas sobre a função biológica e a relevância de genes ainda desconhecidos (QUACKENBUSH 2001).

Os estudos realizados até o momento podem ser divididos em três grandes grupos: os que buscam identificar perfis de tumores, a maioria visando melhoras no diagnóstico de subtipos em tumores morfológicamente homogêneos (LAKHANI e ASWORTH 2001); os que identificam subtipos correlacionados com diferentes prognósticos e ainda os que buscam alvos terapêuticos ou novos marcadores moleculares (MACOSKA 2002).

A utilização de microarrays na determinação de padrões de expressão gênica está gerando uma riqueza de novas informações que ajudarão no diagnóstico do câncer e na escolha da forma de terapia a ser utilizada. Através da utilização de microarrays centenas de genes podem servir como sondas para detectar quais genes estão ativos em diferentes tipos de células, o que gera uma quantidade de informação sem precedentes na história; o que seria muito difícil, ou praticamente impossível utilizando o enfoque gene por gene. Em alguns casos é possível determinar quais cânceres apresentarão resposta frente à terapia e quais não, o que é extremamente vantajoso e apresenta aplicação clínica direta (MARX 2000).

Um trabalho de nosso grupo identificou genes diferencialmente expressos entre tecido gástrico normal e tumoral utilizando um array de 4.500 clones ORESTES (MEIRELES et al. 2003). Avaliando as razões de expressão entre os dois tipos de tecidos e a variabilidade dessa expressão entre as diversas amostras de um mesmo tecido foram selecionados 80 genes capazes de separar perfeitamente, por SOM, tecidos normais e malignos. Diversos trios de genes selecionados dentre os 80 foram também capazes de realizar essa discriminação (MEIRELES et al. 2003).

Em outro estudo, nosso grupo identificou uma série de classificadores moleculares que distinguem amostras cancerosas gástricas das não cancerosas, através da análise de Discriminador Linear de Fisher. Também foram identificadas metaplasias intestinais com perfis de expressão gênica semelhantes ao de adenocarcinoma. Este dado pode ser útil no seguimento dos pacientes, a fim de determinar seu potencial como teste prognóstico para transformação maligna (MEIRELES et al. 2004).

SORLIER et al. (2001) realizaram um trabalho de classificação de carcinomas mamários baseado na variação dos padrões de expressão gênica determinados por microarrays de cDNA e realizaram a correlação das características do tumor com a respectiva resposta clínica. Um total de 85 experimentos de microarrays de cDNA representando 78 cânceres, 3 fibroadenomas e 4 tecidos mamários normais foram analisados por agrupamento hierárquico. Este estudo demonstrou diferentes respostas significativas para os pacientes pertencentes a diferentes grupos. O repertório de genes ativados ou reprimidos é uma representação da biologia do tumor, de modo que a diversidade dos padrões reflete a diversidade biológica. Então, relacionar o padrão de expressão gênica com a resposta clínica é um elemento chave na compreensão dessa diversidade.

Outro estudo baseado em expressão gênica através da utilização de microarrays de DNA foi realizado por WEST et al. (2001). Os dados analisados foram provenientes de uma série de amostras de câncer primário de mama e neste trabalho os autores concluíram que fenótipos clinicamente relevantes podem ser determinados a partir de amostras de tumores de mama primários, através da análise de expressão gênica. O ponto chave deste estudo é a capacidade de identificar não

apenas genes altamente expressos, mas sim aqueles cuja expressão está altamente relacionada com o fenótipo, independentemente do grau de expressão.

2 JUSTIFICATIVA

A falha do tratamento em pacientes que foram submetidos à quimio-radioterapia concomitantes a fim de preservar a laringe pode ser atribuída a múltiplos fatores, como extensão extralaríngea e envolvimento subglótico; mas a dificuldade de prever a ausência de resposta permanece (WEBER et al. 2004).

Desta forma, torna-se extremamente relevante a busca de marcadores que possam prever determinada resposta de pacientes a determinado tipo de tratamento, ou seja, prever o prognóstico. A partir disto este estudo foi concebido com a finalidade de encontrar classificadores moleculares que distinguissem entre os pacientes portadores de carcinoma epidermóide localmente avançado de laringe e hipofaringe, submetidos ao tratamento quimioterápico, com as drogas cisplatina e paclitaxel, concomitante à radioterapia aqueles que serão respondedores e os que serão não respondedores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores moleculares que possam determinar sucesso de resposta ao tratamento com Paclitaxel e Cisplatina, associados à radioterapia em pacientes com carcinoma epidermóide localmente avançado, estádios III ou IV, de laringe e hipofaringe.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de expressão gênica, por cDNA Microarray, em biópsias de tumores avançados de laringe e hipofaringe virgem de tratamento.
- Utilizar ferramentas matemáticas e estatísticas para definir padrões de assinatura molecular de amostras individuais que possam ser relacionados com o grau de resposta ao tratamento com Paclitaxel e Cisplatina associados à radioterapia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

No Hospital do Câncer, o Departamento de Cirurgia em Cabeça e Pescoço realizou um ensaio clínico fase II para preservação de laringe e hipofaringe em carcinoma epidermóide avançado, no qual a terapia foi baseada na associação de radioterapia e quimioterapia com Paclitaxel e Cisplatina.

Neste ensaio clínico fase II (FEHER et al. 2002a e b) 43 pacientes foram admitidos e, como critérios de inclusão, os pacientes deveriam ser portadores de carcinoma epidermóide com estádios clínicos III ou IV, sem metástase à distância e sem tratamento quimio ou radioterápico prévios. Os pacientes foram tratados com doses semanais de Paclitaxel ($30\text{mg}/\text{m}^2$) e Cisplatina ($20\text{mg}/\text{m}^2$) concomitantemente com radioterapia (7040cGy em doses diárias de 180cGy).

No momento da entrada dos pacientes neste estudo foi realizada uma biópsia incisional, através de microlaringoscopia, para confirmação histopatológica da doença e, neste momento, um fragmento de tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Devido a fatores adversos 2 amostras não foram coletadas; deste modo totalizamos 41 amostras. Este estudo foi devidamente aprovado pela comissão de ética do Hospital do Câncer e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento pós-informado.

Os pacientes que não apresentaram resposta completa ou parcial com a dose de radiação de 5040 cGy , com tumor residual no final da radioterapia ou no

momento da recorrência local foram submetidos à laringectomia. A retirada de linfonodos ocorreu em todos os pacientes linfonodos positivos (N1-N3), independente da resposta à quimio-radioterapia.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL E RNA REFERÊNCIA

Em nosso desenho experimental pretendíamos determinar o perfil de expressão gênica por cDNA microarray de várias amostras biológicas, o que tornou necessário normalizar os dados contra um RNA referência. Esta estratégia permite a comparação horizontal das diferentes amostras.

Neste desenho experimental a amostra de referência é uma amostra de RNA marcada com um fluorocromo e hibridizada juntamente com cada um dos RNAs das amostras de interesse, por sua vez marcados com um fluorocromo distinto. Os valores de intensidade dos “spots” nas amostras de interesse são divididos pelos valores obtidos na amostra referência, o que funciona como normalização indireta para as demais amostras, permitindo assim a comparação entre elas (YANG e SPEED 2002).

O RNA referência utilizado foi obtido a partir de fragmentos de laringe e hipofaringe livres de doença, oriundos de margens livres de tumor, provenientes de quatro pacientes operados no Hospital do Câncer e que não participaram do protocolo de preservação de órgãos. Os pacientes selecionados para obtenção do RNA referência não sofreram quimioterapia nem radioterapia previamente à cirurgia.

4.3 CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO E SEMI-MICRODISSECÇÃO

Após a coleta das amostras provenientes de biópsia incisional ou de cirurgia, um corte de cada fragmento foi analisado pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital, chefiado pelo Dr. Fernando Soares, para confirmação do diagnóstico histológico e realização de semi-microdissecção de amostras que apresentaram fragmentos indesejáveis.

Foi realizado o diagnóstico histológico por congelação das 41 amostras de biópsias referentes aos tecidos tumorais e das 4 amostras de tecido normal correspondentes às margens livres de doenças obtidos por cirurgia e utilizadas para extração do RNA referência. Para cada fragmento de biópsia ou cirurgia uma lâmina histológica foi confeccionada, totalizando assim 45 lâminas. Os fragmentos congelados foram semi-microdissecados (ou micro) para retirada de tecido normal contaminante a fim de enriquecer o material de células tumorais, sempre que necessário. Este procedimento é realizado com a finalidade de reduzir a heterogeneidade das amostras de tecido das quais se obtém o RNA para os experimentos de microarray

Apenas amostras com no mínimo 70% de tecido tumoral e com ausência de infiltrado inflamatório visível ou displasia foram utilizadas. Deste modo, após a realização e visualização das lâminas histológicas com o auxílio de um microscópio, 5 das amostras pertencentes ao grupo das tumorais tiveram que ser descartadas. Dentre essas 5 amostras, 4 continham menos de 70% de tecido tumoral e outra

amostra era composta apenas por displasia. Desta forma, das 41 amostras coletadas, apenas 36 foram utilizadas nos experimentos.

4.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS AMOSTRAS E DO RNA REFERÊNCIA

As amostras de tumores de laringe e hipofaringe e ainda as amostras de RNA referência tiveram seus RNAs extraídos. Para a extração de RNA total os fragmentos de biópsia ou cirurgia foram transferidos para tubos contendo 1 ml de TRIZOL[®] (Life Technologies, USA) e triturados com o auxílio de um homogenizador (Polytron[®], Kinematica AG, Switzerland). O RNA foi extraído conforme as instruções do fabricante e dissolvido em água tratada com DEPC (Merck, Germany). A concentração foi determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, France).

4.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS RNAs

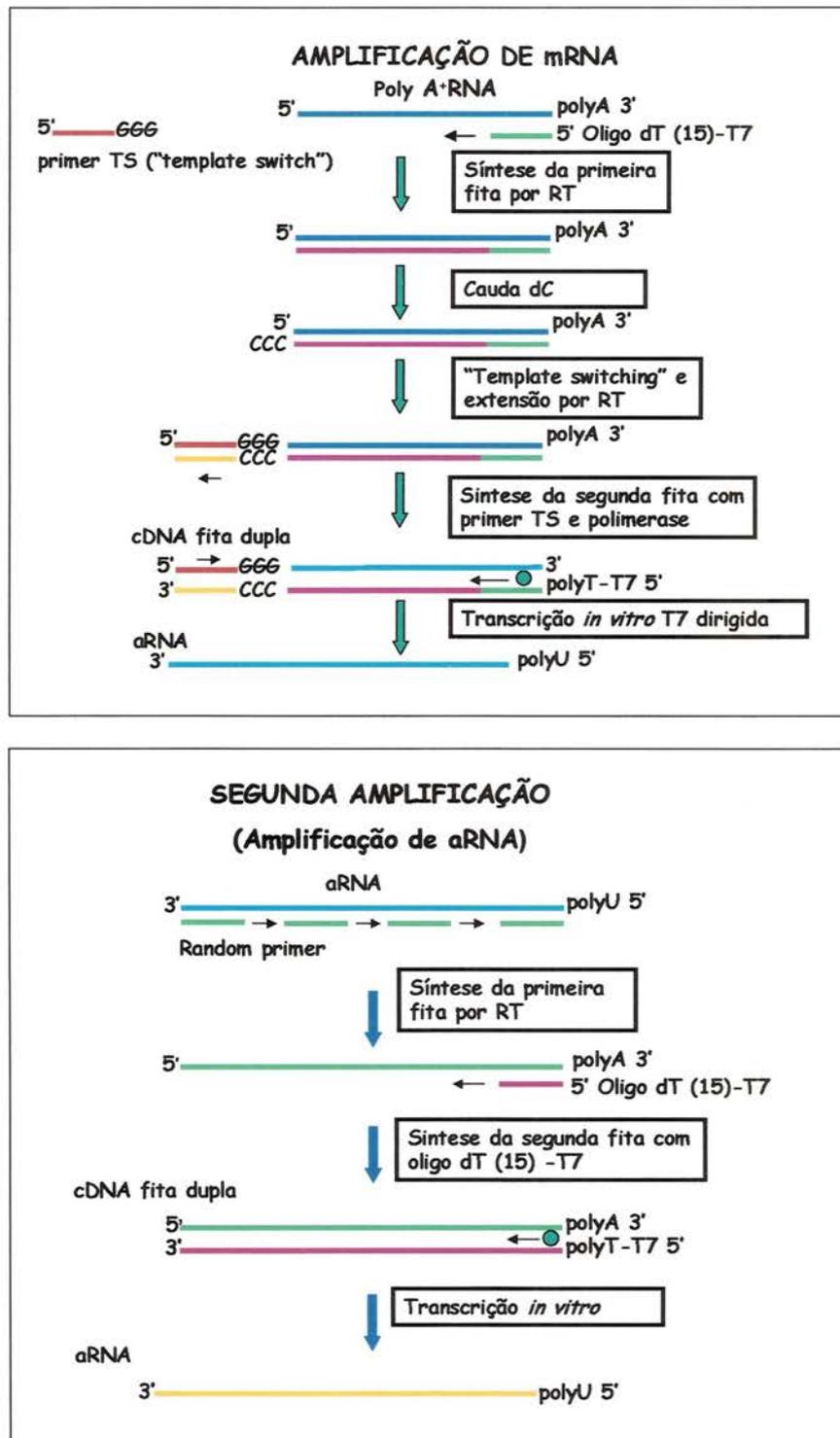
Para avaliar a qualidade do RNA extraído 1 µg de cada amostra foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes (tampão 7M uréia 2x) e corado com brometo de etídio. A análise da integridade do RNA total foi realizada avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO DAS AMOSTRAS TUMORAIS E DO RNA REFERÊNCIA

O protocolo de amplificação baseou-se na metodologia descrita por WANG et al. (2000) com algumas modificações descritas por GOMES et al. (2003). GOMES et al. (2003) validaram a metodologia de amplificação de RNA e sua utilização em experimentos de cDNA microarray, demonstrando a reprodutibilidade dos dados, ausência de viés em relação à amostra de RNA não amplificado e obtenção de maior sinal dos “spots” e menor de “background” quando comparado com RNA não amplificado. Deste modo, este procedimento propicia não apenas aumentar a quantidade mas também a pureza do RNA.

Outro estudo realizado demonstrou que a correlação entre duas hibridizações de RNA amplificado foi bastante superior a de duas hibridizações de RNA total, e que um número maior de genes diferenciais foi identificado no primeiro caso, sugerindo que a amplificação do RNA melhora a qualidade da hibridização e aumenta a capacidade de identificação de marcadores (FELDMAN et al. 2002).

Resumidamente, a transcrição reversa de 1,5 µg de RNA total foi realizada na presença de oligo dT-T7 e a síntese de cDNA de dupla fita baseou-se na propriedade de troca de molde ou “template switching”, seguida de transcrição “in vitro” dirigida pela enzima T7 RNA polimerase. Um segundo ciclo de amplificação iniciado pela transcrição reversa do RNA na presença de oligonucleotídeos aleatórios foi utilizado para aumentar o rendimento da reação (Figura 1).



Fonte: Adaptado a partir de WANG et al. (2000). Elaborado e gentilmente cedido por Luciana Gomes

Figura 1 - Esquema da amplificação de RNA. Esquema do método de amplificação a partir de RNA total, realizado em dois ciclos.

4.7 MARCAÇÃO DO cDNA

O cDNA fluorescente foi preparado por transcrição reversa a partir de 3,0 µg do RNA amplificado (tanto das amostras tumorais quanto do RNA referência), utilizando-se iniciadores aleatórios (“random primer”, dN6; Amersham Biosciences) e foram adicionados 1 µl de uma mistura de cinco RNAs controles transcritos “in vitro” (incluindo o gene Q do fago λ); as reações ocorreram na presença de dCTP marcado com o fluorocromo Cy3 ou com Cy5 (Amersham Biosciences).

Após a marcação da amostra de um determinado paciente os cDNAs da amostra e do RNA referência, cada um marcado com um fluorocromo diferente, foram unidos em um único tubo. Foi realizada a inversão dos fluorocromos, desta forma, para cada amostra foram hibridizadas 2 lâminas. Em uma, a amostra era marcada com Cy3 e a referência com Cy5 (lâmina controle ou “main”) e na outra, a mesma amostra era marcada com Cy5 e a referência com Cy3 (lâmina “swap”). Este procedimento foi realizado para as 35 amostras, totalizando 70 marcações.

A inversão dos corantes (“dye-swap”) é realizada para corrigir a variabilidade da marcação dos fluorocromos, uma vez que a eficiência de marcação e a incorporação de Cy3 é maior que a de Cy5. Além disso, a qualidade e confiabilidade das análises são superiores uma vez que os experimentos são realizados em duplicata (YANG e SPEED 2002).

Após a marcação com os fluorocromos, os cDNAs marcados foram fracionados eletroforéticamente em microgéis de agarose 1% com TAE, em cuba apropriada, como forma de avaliar a qualidade das reações de marcação. Esta técnica foi descrita por CARVALHO et al. (2003) e permite analisar, indiretamente, a

qualidade do RNA a partir do qual foi preparado o cDNA marcado. Aliquotas de 1 μ l das reações de marcação com cada corante foram misturadas a 1 μ l de tampão 6x e 1 μ l de água; a eletroforese foi realizada a 60V por aproximadamente 35 minutos. O gel foi lavado em água e a imagem digitalizada no scanner de câmera CCD.

4.8 CONFECÇÃO DAS LÂMINAS DE cDNA MICROARRAY

Todas as lâminas ou biochips que foram utilizadas neste projeto foram confeccionadas pelo nosso laboratório e tiveram produtos de PCR dos clones ORESTES fixadas em sua superfície. Seqüências ORESTES contidas em plasmídios pUC foram amplificadas em placas de 96 poços e o produto foi purificado em placa com resina G50. Aliquotas destes produtos foram depositadas em lâminas de vidro silanizadas (Corning) onde os elementos foram fixados com o auxílio do robô Flexys (Genomic Solutions). As lâminas foram tratadas e submetidas a “crosslink” em luz UV.

As lâminas utilizadas contêm 4.800 elementos, ou sondas de cDNA, escolhidos a partir de seqüências ORESTES geradas pelo Projeto Genoma do Câncer, a partir de bibliotecas de cabeça e pescoço (língua, laringe e hipofaringe), tireóide, pulmão, bexiga, rim, cólon, próstata, epidídimo, testículo, mama, tumores ginecológicos (vulva, vagina, cérvix e ovário), tumores abdominais (estômago, esôfago, fígado e pâncreas), melanoma, sarcoma, retinoblastoma, leiomiossarcoma, medula óssea e sistema nervoso. Como controles positivos da marcação e hibridização cDNAs dos genes Q do fago λ , *Trp*, *DapB*, *ThrB*, *PheB* e *LysA* foram também depositados nos

biochips. Esses controles são utilizados apenas para análise da qualidade dos dados, e não para normalização dos mesmos.

Os fragmentos de ORESTES imobilizados foram selecionados de acordo com cinco critérios principais: sequências maiores que 300 pb; as sequências correspondem a genes com sequência completa conhecida (“full length”), depositadas no banco de dados RefSeq; as sequências só podem ter um único mapeamento (“hit”) no DNA genômico; as sequências não podem apresentar similaridade maior que 85% em pelo menos 100 pb com qualquer outro cluster presente no banco de dados UNIGENE; e finalmente as sequências correspondem à extremidade mais 3’ do gene orientado no genoma, sendo que os últimos 100 pb são evitados a fim de que a sequência se localize a montante do sítio de poliadenilação.

A lista dos genes que compõem esta coleção pode ser visualizada no seguinte endereço eletrônico: http://www.lbc.ludwig.org.br/~chuck/mapa_lamina.html

4.9 PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO EM LÂMINA DE VIDRO

Previamente à hibridização as lâminas de cDNA microarray foram incubadas em tampão de pré-hibridização (5x SSC, 0,2% SDS, 1% BSA e solução 5x Denhardt's) por no mínimo 6 horas, a 42°C. Foram então lavadas em água, centrifugadas para secagem e montadas na estação de hibridização.

O cDNA alvo marcado foi aquecido a 95°C por 5 minutos e mantido a 70 °C até aplicação sobre a lâmina. As amostras de cDNA marcadas com os fluoróforos Cy3 ou Cy5 foram misturadas e hibridizadas “overnight” no sistema Gene TAC™

Hybridization Station (Genomic Solutions, Inc – Ann Arbor, MI). Foram realizadas 70 hibridizações, uma vez que 35 amostras (ou pacientes) participaram do projeto.

Após as hibridizações, prosseguimos a lavagem das lâminas em três tipos de soluções. Foram realizadas lavagens sucessivas em solução de 2x SSC por 5 minutos sob agitação, e duas vezes em solução de 0,1x SSC-0,1% SDS sob agitação por 10 minutos. Por último, as lâminas foram lavadas duas vezes com solução de 0,1x SSC por 5 minutos sob agitação e, em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 1.000 rpm para posterior leitura em scanner.

4.10 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS

Após a hibridização e lavagem das lâminas as imagens digitais para cada comprimento de onda (fluorocromo) foram adquiridas por leitor confocal a laser. As 70 lâminas foram “escaneadas” e os sinais gerados pelas hibridizações foram capturados e digitalizados pelo scanner a laser ScanArray Express (Packard BioScience) e o “software” ScanArray foi adotado para captura dos valores de intensidade dos “spots”. Para cada amostra analisada foram geradas duas lâminas, a controle (“main”) e a lâmina “swap”, que representam a mesma situação, porém invertendo-se os fluorocromos.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DOS DADOS

Os valores de intensidade dos “spots” de todos os arrays gerados na hibridização foram capturados utilizando-se o “software” ScanArray. As

quantificações das marcações de “spot” e “background” foram obtidas pelo método de histograma, utilizando a mediana dos valores dos pixels e percentis de 80 a 95 para o sinal e 5 a 20 para o “background”, utilizando-se o mesmo programa, ScanArray Express.

Este método constrói um histograma dos valores dos pixels de cada “spot” e permite fixar os percentis que serão utilizados para os cálculos de intensidade de sinal e “background”. Este método é simples, estável e exclui pixels de características extremas do cálculo das intensidades do “spot” e do “background”.

4.12 ANÁLISES MATEMÁTICAS E ESTATÍSTICAS

Após a finalização das quantificações das 70 lâminas as tabelas de intensidade de sinal geradas foram depositadas via “Web page” em um banco de dados, para o Laboratório de Biologia Computacional do Hospital de Câncer, coordenado pela Dra. Helena Brentani. Através de programas computacionais foram realizados os controles de qualidade das lâminas, entre eles gráficos do tipo MM “plot”. Além destes gráficos foi também gerado um cluster hierárquico não supervisionado com distância Euclidiana, utilizando-se o método de médias (“average”), o qual toma as médias das distâncias entre os elementos que compõem um grupo.

As análises de cluster apresentam como objetivo encontrar grupos (cluster) de genes ou de amostras que se comportam de modo semelhante nas condições experimentais estudadas (FREEMAN et al. 2000; ZHANG et al. 2001). O agrupamento de amostras complexas permite identificar subgrupos que, em estudos

de doenças, por exemplo, podem apresentar diferentes prognósticos ou respostas a tratamentos. O agrupamento hierárquico se baseia em uma matriz de distância par a par, a partir do qual as amostras, ou pacientes, mais semelhantes são reunidos dois a dois, sucessivamente, formando uma única árvore hierárquica. Na análise não supervisionada a busca de relação entre os genes ou entre as amostras é realizada sem informação adicional, ou seja, é baseada apenas na expressão gênica dos dados obtidos no experimento (RAMASWAMY e GOLUB 2002; TRICHE et al. 2001).

Outras análises estatísticas foram realizadas em colaboração com os Drs. Eduardo Jordão Neves e Roberto Hirata, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, IME/USP. A abordagem matemática e estatística para análise dos dados gerados por microarray têm sido amplamente discutida na literatura e utilizada com sucesso em nosso grupo (GOMES et al. 2003; MEIRELES et al. 2003; MEIRELES et al. 2004; STOLF et al. 2003; STOLF et al. 2005, “in press”). Estas análises também geraram um cluster hierárquico não supervisionado com distância de correlação, utilizando-se o método completo, que toma o máximo das distâncias entre todos os elementos que compõem um grupo (cluster).

A correção dos valores dos “spots” foi realizada subtraindo do sinal de intensidade de cada “spot” o valor do “background” deste mesmo “spot”; isso foi realizado para cada “spot” individualmente. A seguir, todos os genes que foram utilizados como controles positivos foram removidos das análises, restando um conjunto de 4.600; foram removidos também os “spots” em branco. Após, foi calculada a razão entre canal 1 (Cy3) e canal 2 (Cy5), para todos os genes de todas as lâminas, e então realizada uma transformação nesses valores aplicando logaritmo na base dois (\log_2), fazendo, em seguida, a normalização dos “swaps”, que neste caso é

a média aritmética (para todos os genes) entre os valores de razão citados acima, ou seja, (controle + “swap”)/2.

A normalização dos dados foi realizada utilizando-se o método de loess, que é um método de regressão não linear localmente ponderado, do projeto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>), com $\text{span} = 0,4$ e grau 2.

A normalização visa igualar a intensidade relativa dos dois fluoróforos, uma vez que a intensidade observada para Cy3 é geralmente maior que a observada para Cy5. Deste modo, a normalização ajusta diferenças na marcação e na eficiência de detecção dos dois corantes, bem como diferenças nas quantidades iniciais das amostras (QUACKENBUSH 2001).

Métodos de regressão local como lowess ou loess são ferramentas promissoras para gerar normalizações robustas e flexíveis, por corrigirem variações sistemáticas locais ao invés de adotarem normalizações globais (DUDOIT et al. 2002b). Por esta razão foi adotado o método de loess para a normalização dos nossos dados neste estudo.

Com os dados normalizados foi realizada uma busca dos genes mais diferencialmente expressos e assim foi gerada uma tabela com 100 genes. Para isso foram calculadas as diferenças de média e mediana; foram também realizados os Teste t (paramétrico) e Mann-Whitney (não paramétrico) e encontrados os p valores de ambos os testes. Foi ainda realizado “bootstrap” para recalcular as estatísticas de interesse (diferenças de médias e medianas e a estatística T). Os 100 genes foram ordenados através dos menores p-valores do “bootstrap” da estatística T (não assume normalidade dos dados).

A etapa seguinte foi a identificação de possíveis pares, trios e quadras de classificadores. A identificação de classificadores seguiu a mesma estratégia descrita por MEIRELES et al. (2004). Isso é realizado através de um método chamado de Discriminador Linear de Fisher, através de uma estratégia conhecida como busca e escolha.

Neste caso, partiu-se dos 100 genes com menor p-valor do teste t (neste caso assume-se normalidade dos dados) e foi realizada a busca pelos 100 melhores classificadores. O método de Fisher calcula uma estatística conhecida como SVD ou “singular value decomposition”, e este número representa a razão dos desvios padrões inter sobre intra grupos dos valores de expressão dos genes projetados no sistema de coordenadas encontrados pelo Discriminador de Fisher. O SVD indica quão bem ficam separados os dois grupos estudados (inter grupos) com o conjunto de genes utilizados; medindo o quão compacta estão as duas nuvens de pontos, ou seja, a dispersão dos pontos, e medindo a distância entre as duas nuvens.

Após, foi realizada a validação cruzada, que consiste em um processo iterativo onde em cada iteração é retirada uma amostra do conjunto, recalculado o classificador, classificada a amostra retirada e contado o número de acertos. Quanto maior for o CV, mais eficiente é o classificador; neste caso, como temos 35 amostras, $CV = 35$ indica um ótimo classificador, por classificar corretamente em 100% dos casos pacientes respondedores e pacientes não respondedores.

Além destas análises foram ainda criadas matrizes de correlação e matrizes de p-valor da diferença de correlações, as quais medem a correlação linear de Pearson entre pares de genes nas duas populações. Para calcular os p-valores das matrizes de diferença de correlações foram utilizados os resultados da transformação z de Fisher,

que tem uma distribuição normal sob a hipótese nula (os valores de correlações são iguais). Esta correlação mede o quanto a distribuição de uma variável (que são os valores observados para um gene) explica a distribuição de outra variável. Nas matrizes de correlação a cor vermelha indica correlação positiva, ou seja, sempre que um gene apresenta expressão aumentada o seu par também apresenta expressão aumentada; ou ainda quando um gene apresenta expressão diminuída o seu par também apresenta expressão diminuída. Já a cor verde indica correlação negativa entre os pares de genes, ou seja, quando um deles apresenta expressão aumentada o seu par apresenta expressão diminuída, ou vice-versa. Quando a cor é preta significa que a correlação entre o par de genes é zero.

Para a realização das matrizes de correlação foram selecionados genes que faziam parte de uma mesma via metabólica selecionada pelo KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, <http://www.genome.jp/kegg/>), deste modo os genes foram agrupados por classes funcionais. Foram realizadas as análises referentes às 18 vias existentes no KEGG.

Outra análise realizada foi a busca exaustiva de classificadores a partir dos genes presentes nessas 18 vias metabólicas. Esta é uma análise de algoritmo de aprendizado supervisionado, e utilizou máquina de suporte vetorial (SVM, “support vector machine”) e K vizinhos (KNN, K “nearest neighbors”), e da mesma forma que a busca de classificadores anterior realizou uma validação cruzada.

As ferramentas de análise supervisionada buscam construir classificadores que associem classes pré-definidas a determinados padrões de expressão gênica. Tais classificadores são tipicamente construídos com base nos dados de parte das amostras classificadas a priori, utilizados para a seleção dos melhores caracteres,

neste caso, genes capazes de separar os grupos conhecidos (BRAZMA e VILO 2000; RAMASWAMY e GOLUB 2002).

Foi realizada ainda uma análise não supervisionada, que consistiu na criação de clusters baseados nas mesmas vias metabólicas utilizadas anteriormente, através de Km (*K*-Médias)

5 RESULTADOS

5.1 SEGUIMENTO CLÍNICO DOS PACIENTES

Os prontuários dos 35 pacientes que fizeram parte do projeto foram atualizados em outubro de 2004 e os dados e seguimento clínico dos mesmos estão apresentados nas tabelas 1 e 2. A data de entrada dos pacientes, que foi o momento da coleta das biópsias, variou de 19 de julho de 1999 a 05 de novembro de 2001. Temos um seguimento clínico dos pacientes que varia de 3 a 5 anos; este seguimento clínico é considerado adequado, uma vez que recidivas locais deste tipo de câncer costumam aparecer nos dois primeiros anos.

Todos os pacientes foram acompanhados mensalmente durante os primeiros 6 meses e a cada 2 meses até o final do primeiro ano de seguimento. Durante os segundo e terceiro anos os pacientes foram acompanhados a cada 3-4 meses e após o terceiro ano as consultas ambulatoriais ocorreram a cada 6 meses. Exames clínicos e videolaringoscopia foram realizados em todas as consultas e tomografia computadorizada e raio-X de tórax foram realizados a cada 6 meses. Sempre que uma lesão suspeita era identificada os pacientes eram submetidos a laringoscopia sobre efeito de anestesia geral

Dentre os 35 pacientes, 21 (60%) apresentaram resposta completa (R) ao tratamento, ou seja, a evidência de doença local desapareceu por completo através do tratamento quimio-radioterápico, confirmado por tomografia computadorizada, endoscopia e, sempre que necessário, biópsia; nesses pacientes ocorreu a preservação

do órgão. Em contrapartida, 14 pacientes (40%) não responderam ao tratamento (NR), já que os mesmos não obtiveram a preservação do órgão.

Detalhadamente, entre os pacientes não respondedores houve 1 paciente em que a doença local nem sequer diminui de tamanho e 4 pacientes em que a resposta foi parcial, ou seja, houve diminuição do tumor mas não o seu desaparecimento. Esses 5 pacientes apresentaram doença persistente, tendo um deles apresentado metástase à distância, e dois deles foram submetidos à laringectomia total de resgate para controle local da doença. Além disto, 9 pacientes apresentaram recorrência local, casos em que inicialmente houve uma resposta completa com posterior recidiva local.

Os 30 pacientes restantes apresentaram resposta completa (evidência do desaparecimento de câncer local 1 mês após o término da quimio-radioterapia), mas 15 foram acometidos por recorrência. Dentre esses quinze, 7 apresentaram recorrência local, 2 apresentaram recorrência local combinada com metástase à distância e 6 foram acometidos por metástase à distância. Oito pacientes dentre esses 15 foram submetidos à laringectomia total de resgate.

Os 15 pacientes (42,9%) restantes apresentaram uma resposta completa prolongada e permaneceram livre de doença a longo termo (mais de 40 meses).

Um total de 14 pacientes (40%) apresentaram doença persistente ou recorrência local (NR) e 10 eram elegíveis para laringectomia total de resgate. Dentre os 4 pacientes restantes, 2 não foram submetidos à laringectomia de resgate devido ao diagnóstico concomitante de metástase à distância, e os outros 2 por apresentarem doença loco-regional avançada e irressecável.

Os 15 pacientes sem evidência de doença e os 6 pacientes que apresentaram “apenas” metástase à distância foram classificados como apresentando resposta local completa, ou respondedores (R).

Entre os 21 pacientes classificados como respondedores, 5 (23,8%) foram a óbito; 2 deles devido à metástase pulmonar, um por metástase pulmonar e óssea, outro por metástase pulmonar e no sistema nervoso central e outro paciente por metástase óssea. Já entre os paciente não respondedores o número de óbitos foi consideravelmente maior, acometendo 8 dos 14 pacientes (57,14%); 3 desses pacientes foram a óbito devido à doença local, 1 por doença linfonodal, 1 por doença local e linfonodal, 1 por metástase pulmonar e doença local, 1 por metástase pulmonar, óssea e em partes moles e ainda 1 paciente foi a óbito devido á metástase pulmonar, doença local e linfonodal.

As taxas de sobrevida global entre respondedores e não respondedores foram de 53,9% em 5 anos e 33,3% em 4 anos, respectivamente, com $p=0,0005$ (figura 2) e as taxas de sobrevida livre de doença para respondedores e não respondedores foram de 71,4% em 5 anos e 0% em 2 anos, respectivamente, com $p<0,001$ (figura 3).

Tabela 1 - Características dos 35 pacientes que fizeram parte do estudo.

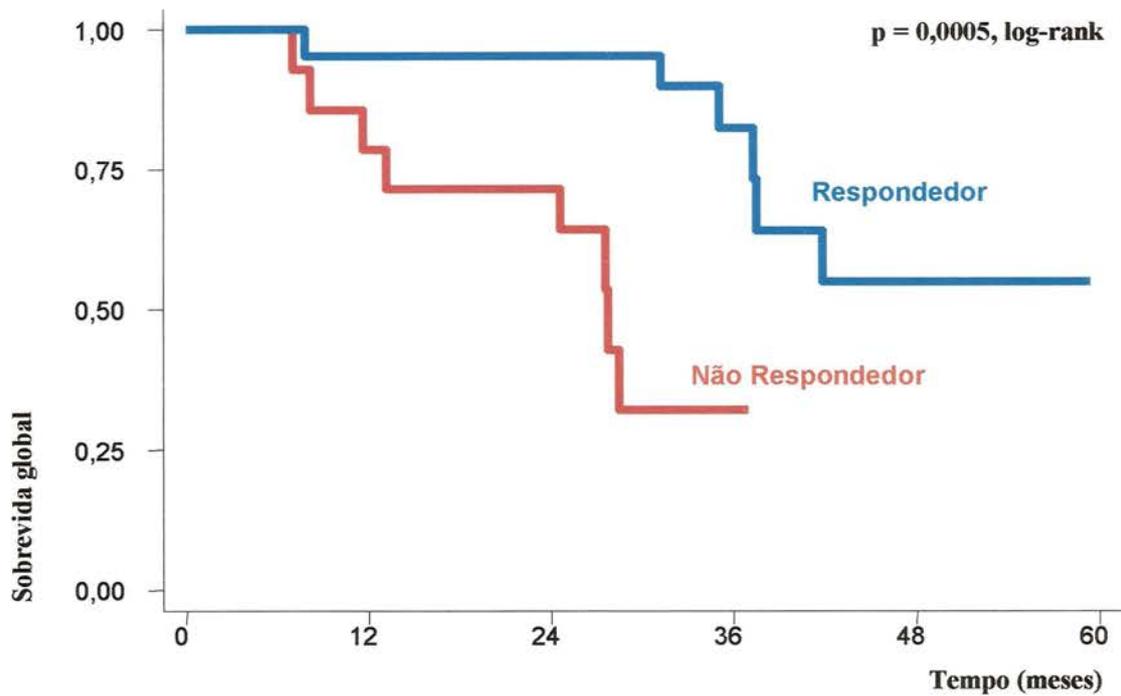
	Sítio	Classificação	TNM ^(a)	Resposta ^(b)
3	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T4N1M0	NR
4	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide basalóide	T3N2aM0	R
5	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide basalóide com diferenciação neuroendócrina	T4N1M0	NR
5	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N1M0	NR
7	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T4N2aM0	R
3	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	NR
3	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T4N2aM0	NR
0	laringe glótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado úlcerao	T3N0M0	R
1	hipofaringe retro-cricóide	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N3M0	NR
2	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T2N3M0	R
3	laringe glótica e supraglótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T4N0M0	NR
4	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T3N0M0	NR
5	laringe glótica e supraglótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	NR
5	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T4N0M0	R
7	laringe glótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	R
3	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T4N0M0	R
3	laringe glótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T3N0M0	R
0	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	R
1	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T4N1M0	NR
2	laringe glótica	carcinoma epidermóide pouco diferenciado	T3N0M0	R
3	laringe glótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	R
4	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N2bM0	NR
5	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N2bM0	R
5	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide pouco diferenciado	T3N0M0	R
7	laringe glótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	NR
8	laringe glótica	carcinoma epidermóide pouco diferenciado	T3N0M0	NR
9	laringe glótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T4N0M0	R
0	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide basalóide	T4N2bM0	R
1	laringe supraglótica	CE pouco diferenciado com intensa inflamação crônica	T4N2cM0	R
2	hipofaringe seio piriforme	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N1M0	NR
3	laringe glótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T3N1M0	R
4	laringe glótica	carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	T3N0M0	R
5	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide bem diferenciado	T3N3M0	R
5	laringe supraglótica	carcinoma epidermóide do tipo basalóide	T3N1M0	R
7	laringe glótica	carcinoma epidermóide invasivo moderadamente diferenciado	T3N0M0	R

^(a)TNM=tumor-node-metastases. ^(b)R=paciente respondedor ao tratamento (60%) e NR=paciente não respondedor (40%).

Tabela 2 - Características clinicopatológicas dos 35 pacientes incluídos no projeto, estádios III ou IV, sem metástase à distância e sem tratamentoprévio.

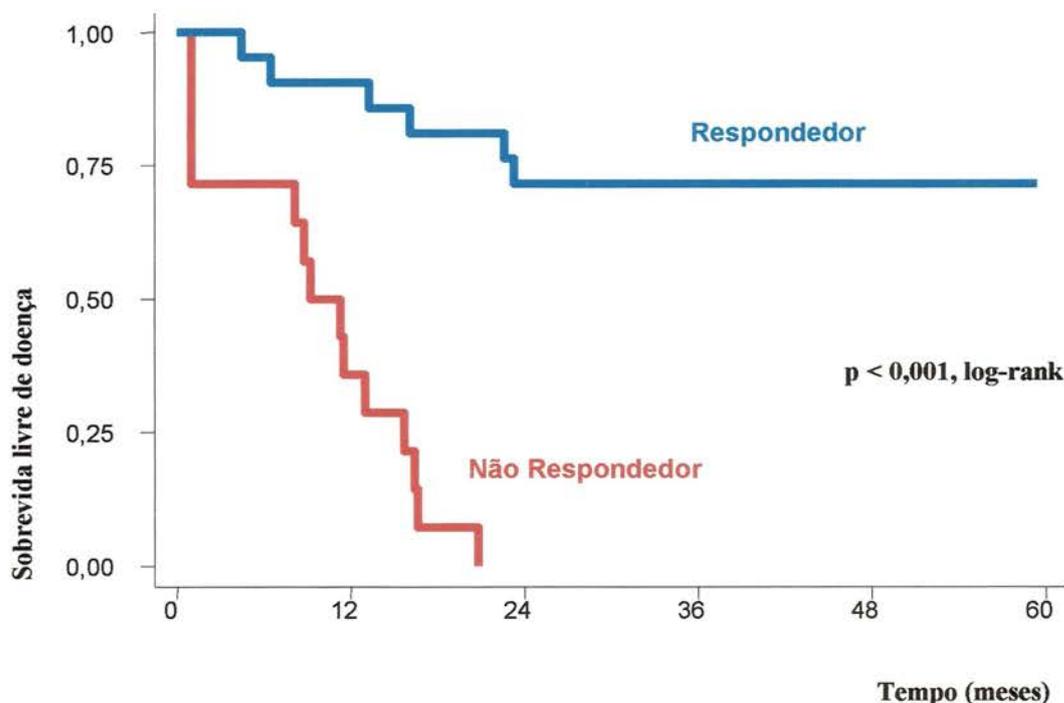
Características	Nº de pacientes	%
Idade (anos)		
Média	57,5	
Intervalo	39-74	
Gênero		
Masculino	29	83
Feminino	6	17
Sítio acometido		
Laringe Supraglótica	11	31
Laringe Glótica	11	31
Laringe Subglótica	0	0
Laringe Transglótica ^(e)	2	6
Hipofaringe - Seio Piriforme	10	29
Hipofaringe - Retro-Cricóide	1	3
Tabagismo		
Positivo	33	94
Negativo	2	6
Etilismo		
Positivo	29	83
Negativo	6	17
Diagnóstico histológico		
CE bem diferenciado	9	26
CE moderadamente diferenciado	18	51
CE pouco diferenciado	4	11
CE basalóide	3	9
CE basalóide com diferenciação neuroendócrina	1	3
T		
1	0	0
2	1	3
3	23	66
4	11	31
N		
0	18	51
1	7	20
2a-c	7	20
3	3	9

^(e)Laringe transglótica é tumor que acomete glote e supraglote.



Legenda: Sobrevida global dos pacientes respondedores: em 2 anos = 95,2% (95% IC: 70,7% – 99,3%) e em 5 anos = 53,9% (95% IC: 22,8% - 77,2%). Curva de sobrevida global dos pacientes não respondedores: em 2 anos = 71,4% (95% IC: 40,6% – 88,2%) e em 4anos = 33,3% (95% IC: 9,6% – 59,8%). A curvas de sobrevida global foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o p valor pelo teste log-rank.

Figura 2 - Curva de sobrevida global.



Legenda: Sobrevida livre de doença dos pacientes respondedores: em 2 anos = 71,4% (95% IC: 47,2% – 86,0%) e em 5 anos = 71,4% (95% IC: 47,2% – 86,0%). Sobrevida livre de doença dos pacientes não respondedores: em 2 anos = 0,0%. As curvas de sobrevida livre de doença foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o p valor pelo teste log-rank.

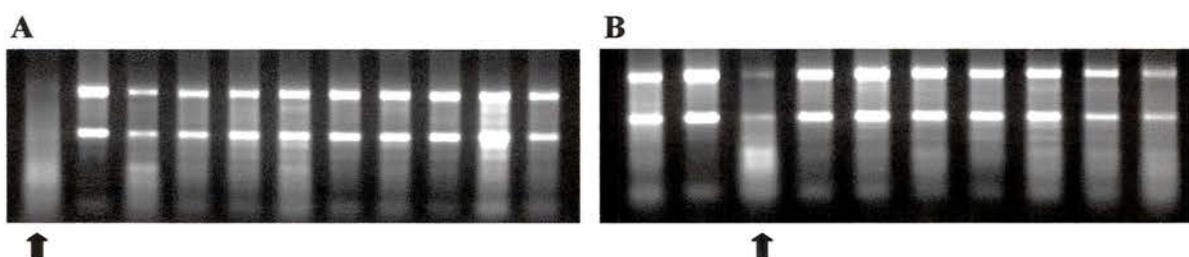
Figura 3 - Curva de sobrevida livre de doença.

5.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS RNAs EXTRAÍDOS

Dentre as 36 amostras tumorais extraídas apenas 4 apresentaram RNA com relação 28S/18S < 1 (duas amostras indicadas por setas nas figuras 4A e 4B). As 32 amostras restantes apresentavam RNA com relação 28S/18S \geq 1 e o perfil eletroforético de 21 amostras é apresentado na figura 4.

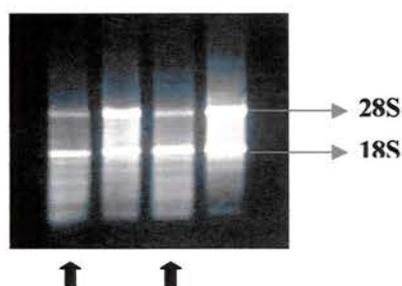
Dentre as 4 amostras a serem utilizadas como RNA referência duas delas (indicadas pelas setas na figura 5) não foram utilizadas devido à degradação do RNA, uma vez que apresentava relação 28S/18S < 1. As amostras restantes, provenientes de margem livre de doença, uma referente à laringe e outra à

hipofaringe apresentaram RNA de qualidade ($28S/18S \geq 1$) e foram utilizadas como RNA referência em todas as hibridizações. Para isto, essas amostras foram reunidas em um único “pool” e a quantificação final foi realizada por leitura de absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, France), apresentando um rendimento final de 94,0 μ g. Este “pool” de RNA foi utilizado em todas as hibridizações já que utilizando-se o mesmo “pool” de RNA referência para todos os experimentos são diminuídos os viés.



Legenda: Perfil eletroforético das bandas 28S e 18S do RNA total extraído de algumas amostras tumorais. 1 μ g de RNA total de amostra foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes e corado por brometo de etídeo. As setas indicam amostras com degradação de RNA.

Figura 4 - Avaliação da integridade dos RNAs extraídos de amostras tumorais.



Legenda: Perfil eletroforético dos 28S e 18S do RNA total extraído das amostras de RNA referência. 1 μ g de RNA total de amostra foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes e corado por brometo de etídeo. As setas indicam as bandas referentes aos RNA ribossômicos 28S e 18S.

Figura 5 - Avaliação da integridade dos RNAs extraídos de amostras normais.

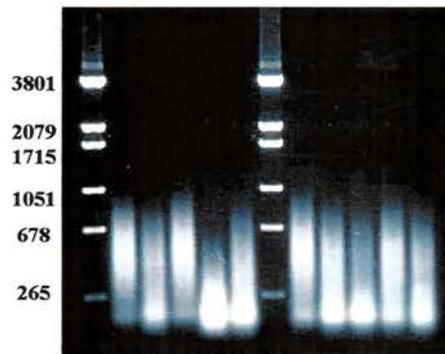
5.3 AMPLIFICAÇÃO

Para a amplificação do RNA partimos de 1,5 µg de RNA total. Os rendimentos para as duas etapas de amplificação de mRNA variaram de 38 a 1.150 vezes, considerando, nos cálculos, que 5% do RNA total seja mRNA. Atribuímos a variação nos rendimentos obtidos a diferenças na qualidade, isto é, pureza, do RNA total das amostras utilizadas.

Como nossa proposta foi realizar as hibridizações em duplicata, seriam necessários 6 µg de mRNA para realizá-las. Para obtenção desta quantidade de RNA cada amostra foi amplificada tantas vezes quanto necessário para a obtenção de, no mínimo, 6 µg de mRNA.

O “pool” de RNA referência previamente extraído foi amplificado utilizando-se o mesmo protocolo, até a obtenção de material suficiente para no mínimo as 70 hibridizações; em seguida, todo o material amplificado foi reunido em um único “pool”, evitando-se assim inserção desnecessária de viés. O RNA referência é uma mistura de moléculas utilizado como amostra controle para gerar medidas de razão para as diferentes amostras testes, permitindo assim a subsequente análise entre as amostras respondedoras e as não respondedoras. Sua utilização não influencia nos resultados encontrados.

A qualidade dos RNA amplificados foi avaliada através do perfil eletroforético das amostras, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Foram utilizados 1 µg de RNA de cada amostra e 5µl de tampão 7 M uréia 2x (figura 6).



Legenda: Visualização de dez amostras de RNA amplificado. 1µg de RNA amplificado foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes e corado por brometo de etídeo. A primeira e a sétima canaletas são referentes ao marcador de tamanho, pel Hind III, em base.

Figura 6 - Avaliação da integridade dos RNAs amplificados.

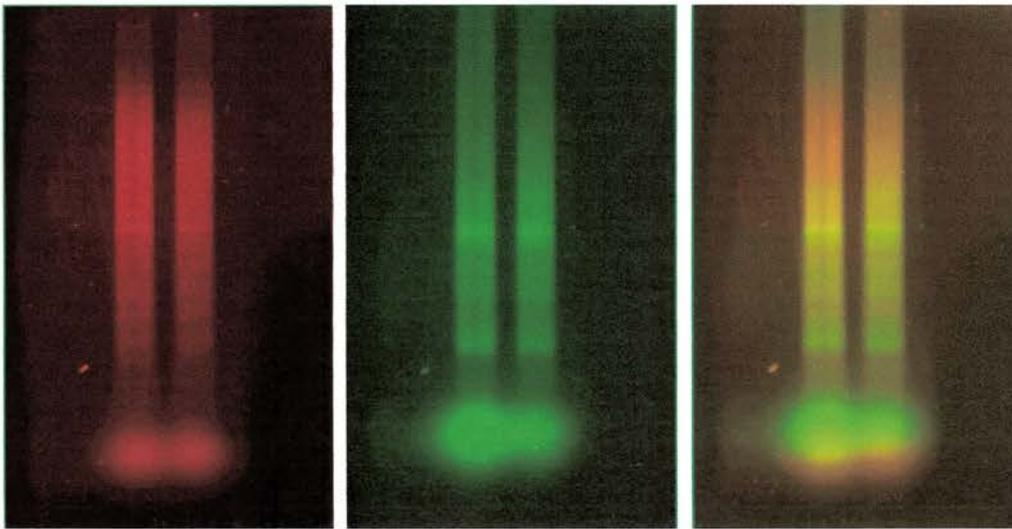
5.4 HIBRIDIZAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS E QUANTIFICAÇÃO DOS DADOS

A qualidade dos produtos da síntese de cDNA fluorescente marcados com Cy3 e Cy5 foi avaliada após fracionamento eletroforético dos cDNAs marcados em microgéis seguindo protocolo descrito por CARVALHO et al. (2003). Este procedimento permite analisar, indiretamente, a qualidade do RNA amplificado a partir do qual foi preparado o cDNA marcado e também a qualidade da incorporação dos fluoróforos. O cDNA sintetizado apresentou uma qualidade muito boa, quando avaliamos o “smear” (figura 7) apresentado no gel e a alta relação sinal/“background” nos canais ch1 (Cy3) e ch2 (Cy5), 6,4x e 7,9x, respectivamente.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas e “escaneadas” por leitor confocal a laser e imagens digitais para cada fluorocromo foram adquiridas (figura 8). Em seguida realizou-se a quantificação de cada uma das lâminas através do

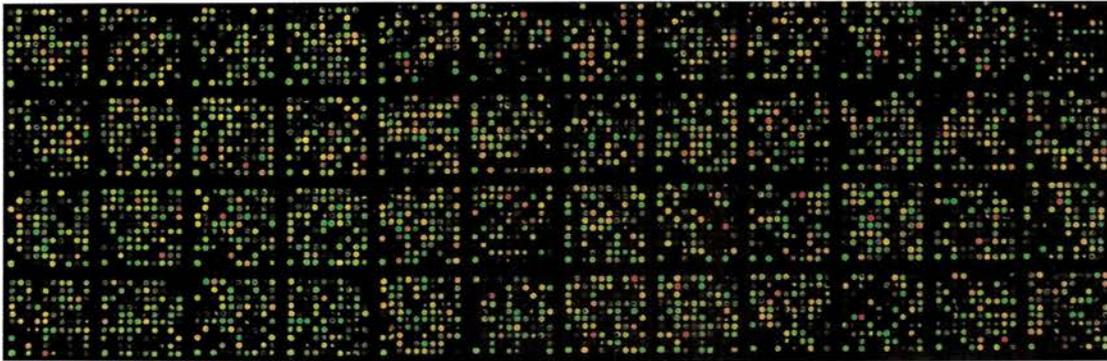
“software” ScanArray Express (figura 9) para geração das tabelas de valores de intensidade de sinal e “background”.

Em geral foram observadas imagens de qualidade muito boas (figura 8), com valores de intensidade do “background” baixos e homogêneos e valores de intensidade dos “spots” altos e também homogêneos, ou seja, sinal alto de “spots” e baixo de “background”.



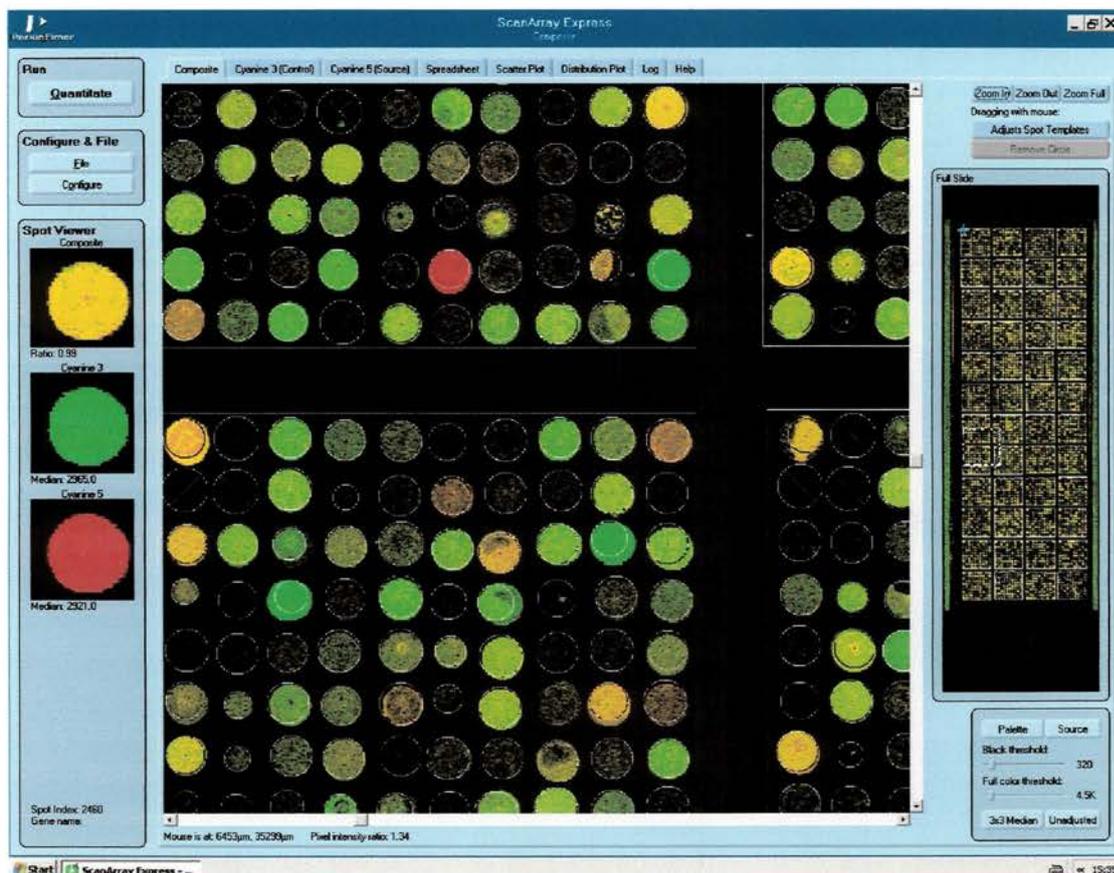
Legenda: Eletroforese de alíquotas de cDNA marcado com Cy3 e Cy5, realizado após transcrição reversa na presença de dCTP acoplado com Cy3 e Cy5. Visualização dos cDNAs marcados nos comprimentos de onda correspondentes às emissões de Cy3 (à esquerda, em vermelho), Cy5 (no centro, em verde) e ambos, na imagem composta (à direita, em amarelo). As cores de Cy3 e Cy5 estão invertidas devido ao processamento da imagem pelo programa GeneTac.

Figura 7 - Avaliação da qualidade de marcação do cDNA.



Legenda: Visualização de lâmina de vidro 4.8K, após a hibridização de uma amostra tumoral com a referência e sua posterior leitura em scanner a laser.

Figura 8 - Lâmina hibridizada.



Legenda: Imagem da quantificação de uma lâmina utilizando-se o “software” ScanArray Express. As imagens obtidas separadamente dos dois corantes estão sobrepostas, formando a imagem composta.

Figura 9 - Quantificação de lâmina.

5.5. ANÁLISES MATEMÁTICAS E ESTATÍSTICAS

As análises de controle de qualidade realizadas em colaboração com o Laboratório de Biologia Computacional geraram como resultados principais gráficos do tipo MM “plot” (figura 10), que calculam a correlação de Pearson entre os “spots” da lâmina controle e os da lâmina “swap”. Quanto mais próximo de 1 for o resultado, melhor é a correlação entre as lâminas. Neste estudo, os resultados variaram de 0,58 (figura 10A) a 0,9535 (figura 10B), demonstrando a ótima qualidade das lâminas e dos dados gerados, dispensando a necessidade de se refazer as hibridizações.

Foi também gerado um cluster hierárquico, no qual 100% das lâminas controles parearam-se com seu devido “swap”, novamente demonstrando a qualidade dos dados.

Após a normalização dos dados, foi gerado um cluster hierárquico não supervisionado (figura 11), que de modo semelhante ao anterior também demonstrou que todas as lâminas controles parearam-se com seus respectivos “swaps”.

O próximo passo foi a criação de uma tabela com os 100 genes mais diferencialmente expressos, ordenados pelo menor p valor de “bootstrap” da estatística T (tabela 3). Esta tabela foi criada a partir da diferença de médias, em log na base dois, subtraindo-se os valores dos genes encontrados dos pacientes respondedores dos não respondedores, desta forma os genes que apresentam valores de “fold mean” positivos estão mais expressos nos pacientes respondedores, e os genes com valores negativos de “fold mean” estão mais expressos nos pacientes não respondedores.

A análise seguinte realizada foi a busca de classificadores através do método de Discriminador Linear de Fisher. Não foram encontradas duplas de genes com CV = 35, ou seja, que acertassem a classificação dos pacientes em 100% dos casos. Mas, foram encontrados 4 trios de genes (tabela 4) e 27 quadras (tabela 5) que separaram com 100% de acerto pacientes respondedores dos não respondedores (CV =35). Foram criados gráficos do tipo “scatter plot 3D” para melhor visualização dos classificadores formados pelos trios de genes. Nota-se que é possível encontrar um plano, nos 4 casos, que separa perfeitamente pacientes respondedores (esferas azuis) dos não respondedores (esferas vermelhas) (figura 12A-D).

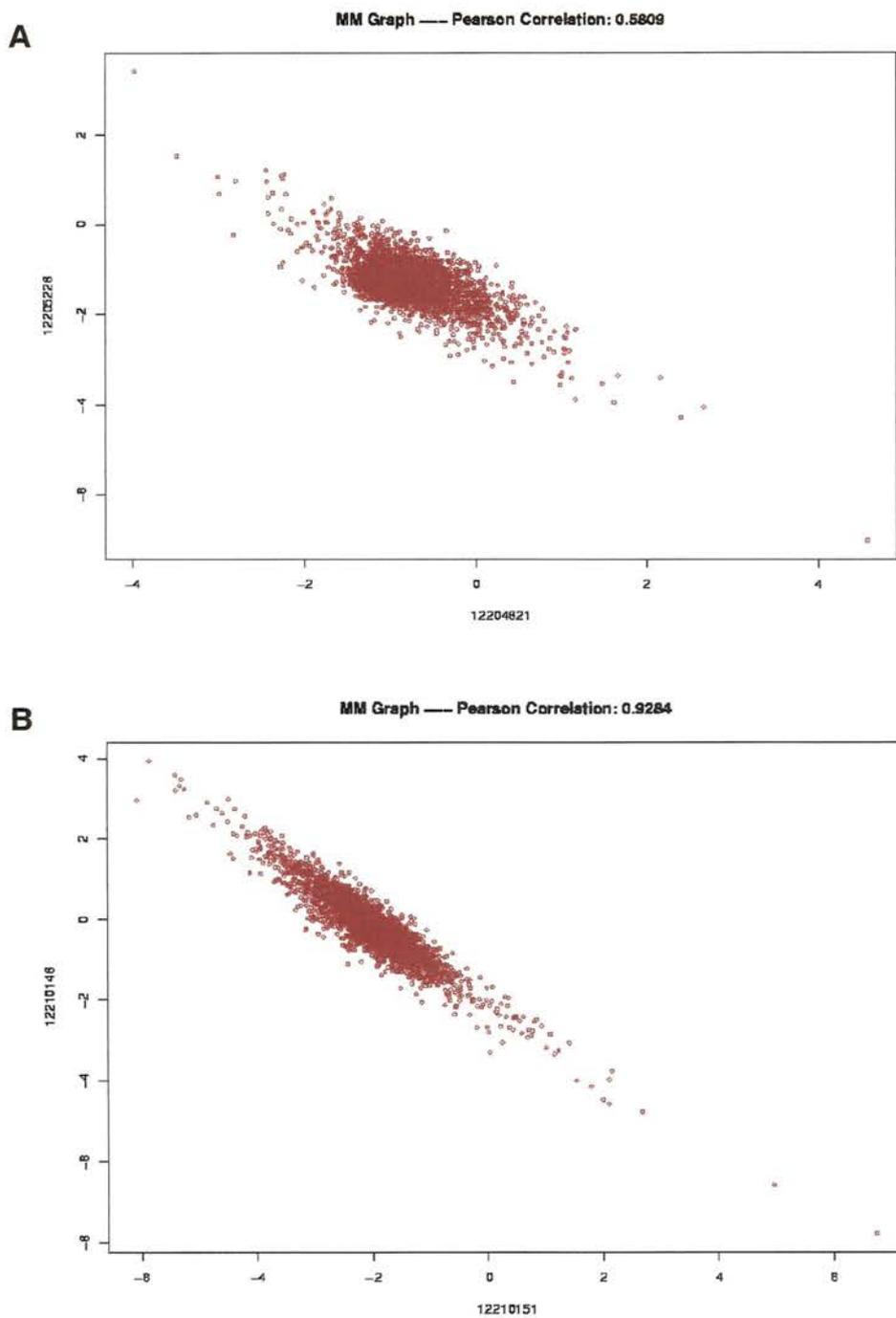
Os genes ATP9B (ATPase, “Class II, type 9B”), Hs.218008 (“current cluster: Hs.389311, hypothetical protein MGC13057”), IFIT1 (“interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1”) e KIAA0819 (MICAL3, “flavoprotein oxidoreductase”) fazem parte dos trios que separam os dois grupos de pacientes através do perfil de expressão (figura 12 A-D) e estão mais expressos nos pacientes respondedores. Já os genes KIAA1691 (TTYH3, “tweety homolog 3 (Drosophila”), FAD104 (FNDC3B, “fibronectin type III domain containing 3B”), PPP1R9B (“protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B, spinophilin”), KDELR3 (KDEL (“Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3”), TRIM9 (“tripartite motif-containing 9”), LAMA3 (“laminin, alpha 3”) e TRIM2 (“tripartite motif-containing 2”) estão mais expressos nos pacientes não respondedores.

Foram ainda realizadas as análises referentes às 17 vias existentes no KEGG e criadas matrizes de correlação de Pearson para os pacientes respondedores e não respondedores, como adesão, apoptose (figuras 13 e 14), ciclo celular (figuras 16 e 17), citocina e sinalização, entre outras vias. As figuras 15 e 18 são matrizes de p-

valor da diferença de correlação, que representam o que existe de diferente entre os grupos de pacientes respondedores e não respondedores. Nestas matrizes o valor de correlação varia de -1 a 1 e a nuance de cores vai do preto ao vermelho, passando pelo azul (valor zero); a cor vermelha indica as correlações mais significativas entre esses pares de genes (valor 1), ou seja, possuem os menores p-valores, enquanto que a cor preta representa as correlações menos significativas (valor -1).

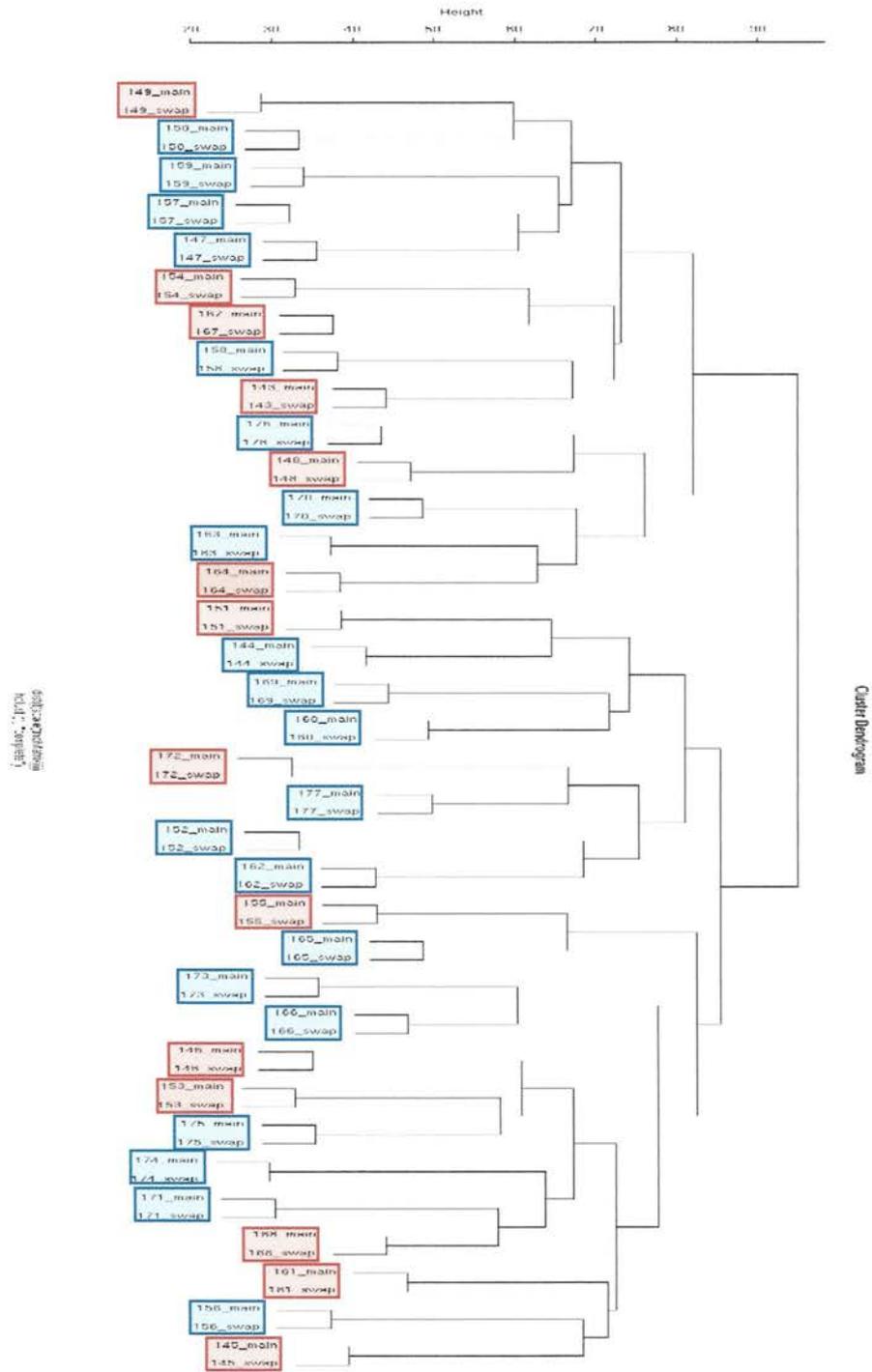
Além dessas análises foi realizada uma busca exaustiva de classificadores a partir dos genes presentes nas 17 vias metabólicas do KEGG. Esta análise apresentava como objetivo encontrar trios de genes que servissem como classificadores moleculares; mas não foi encontrada nenhuma via, ou genes pertencentes às vias, que separasse perfeitamente os dois grupos de pacientes, com $CV = 35$.

A última análise realizada foi a criação de clusters, de modo não supervisionado, de cada uma das vias do KEGG. Não obtivemos nenhum cluster de genes que separasse de alguma forma os dois grupos de pacientes (figuras 19 e 20).



Legenda: Exemplo de gráficos utilizados para controle de qualidade das amostras. O painel A demonstra a amostra 170, que apresentou a menor correlação entre as duplicatas. O painel B demonstra a amostra 165, que apresentou a maior correlação entre as duplicatas.

Figura 10 - Gráficos MM “plot”.



Legenda: Cluster hierárquico não supervisionado das amostras controles e “swaps” baseado na expressão de todos os genes da lâmina. A cor azul indica R e vermelho NR.

Figura 11 - Cluster hierárquico.

Tabela 3 - Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos. “Fold mean” positivo significa gene mais diferencialmente expresso nos pacientes respondedores e menos nos não respondedores; e vice-versa.

Gene.name	Annotation	Fold.mean	W.p.value	T.boot.p.value
CGI-38	brain specific protein	13.777	2,39E+02	0.000050
FAD104	FAD104	-0.7309	2,01E+02	0.000100
CALU	Calumenin	-0.8582	2,39E+02	0.000150
KIAA1691	KIAA1691 protein	-0.6437	1,98E+01	0.000200
MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2	0.638	3,92E+02	0.000200
SMCY	Smcy homolog, Y chromosome (mouse)	13.086	1,69E+02	0.000350
DKFZP566C134	DKFZP566C134 protein	0.6276	2,01E+02	0.000350
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	0.7076	3,03E+01	0.000500
SNAI2	snail homolog 2 (Drosophila)	-0.9507	4,61E+02	0.000600
DKFZP434K046	hypothetical protein DKFZp434K046	0.5015	1,32E+03	0.000850
C3AR1	complement component 3a receptor 1	0.1879	1,14E+03	0.000950
ITGB5	74 integrin, beta 5	-0.6629	8,51E+02	0.001050
b5+b5R	30 flavohemoprotein b5+b5R	0.6048	3,33E+02	0.001100
DKFZp762C1112	hypothetical protein DKFZp762C1112	-0.4186	5,39E+02	0.001350
ATP8A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1	0.1503	1,74E+03	0.001400
T1A-2	lung type-I cell membrane-associated glycoprotein	-0.5417	1,74E+03	0.001550
KIAA0819	KIAA0819 protein	0.1288	9,87E+02	0.001600
GTF3C1	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	0.1692	1,14E+03	0.001700
P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	-0.8405	3,37E+03	0.001950
ECHS1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	0.4633	2,96E+03	0.002050
DKFZP564O043	hypothetical protein DKFZp564O043	-0.3513	4,61E+02	0.002200
FACL5	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5	0.7699	2,28E+03	0.002250
CTPS2	CTP synthase II	-0.2188	2,60E+03	0.002850
Hs.376222	Homo sapiens cDNA FLJ38352 fis, clone FEBRA1000148.	0.4779	2,28E+03	0.003050
DDEF2	development and differentiation enhancing factor 2	-0.5826	4,89E+03	0.003100

CTDP1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase, subunit 1	0.2855	4,32E+03	0.003200
LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	-0.2802	2,60E+03	0.003300
FLJ30058	hypothetical protein FLJ30058	0.3376	1,74E+03	0.003400
GMEB1	glucocorticoid modulatory element binding protein 1	-0.2233	3,37E+03	0.003450
DKFZP434A1315	hypothetical protein DKFZp434A1315	-0.2593	3,82E+03	0.003500
TEAD2	TEA domain family member 2	-0.2945	1,32E+03	0.003550
MCF2L	cell line derived transforming sequence-like	0.1532	4,89E+03	0.003650
C21orf59	chromosome 21 open reading frame 59	0.6393	3,82E+03	0.004200
FLJ12565	hypothetical protein FLJ12565	0.1616	1,99E+03	0.004300
ARTN	Artemin	-0.9034	2,28E+03	0.004600
FLJ21736	hypothetical protein FLJ21736	0.5588	9,80E+03	0.004700
APP	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	-0.6122	2,96E+03	0.004850
CKMT2	creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	0.5725	2,28E+03	0.005000
REC8	Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the rad21p family	0.2512	2,73E+04	0.005100
Jade-1	PHD protein Jade-1	0.3097	8,76E+03	0.005200
LOC199692	similar to Zinc finger protein 136	-0.2819	4,32E+03	0.005400
CGBP	CpG binding protein	0.2811	6,97E+03	0.005500
GNA12	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12	-0.5507	6,97E+03	0.005500
Hs.125063	Homo sapiens cDNA FLJ13825 fis, clone THYRO1000558.	0.4575	4,89E+03	0.005800
SLC7A8	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	-0.8661	1,99E+03	0.006150
T54	T54 protein	0.2615	4,32E+03	0.006150
BBS2	Bardet-Biedl syndrome 2	0.2333	1,09E+04	0.006250
KIAA0963	KIAA0963 protein	0.3519	4,89E+03	0.006300
LAMA3	laminin, alpha 3	-11.964	6,97E+03	0.006400
ATP5L	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g	0.4603	9,80E+03	0.006400
HD	huntingtin (Huntington disease)	0.4995	6,97E+03	0.006500
ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	-0.0783	1,09E+04	0.006700
TPBG	trophoblast glycoprotein	-0.6228	5,51E+03	0.006800

KIAA0095	KIAA0095 gene product	0.343	3,37E+03	0.007000
ZNF151	zinc finger protein 151 (pHZ-67)	0.1284	5,51E+03	0.007050
RALA	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)	-0.4835	1,09E+04	0.007250
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	-0.929	1,36E+04	0.007300
GHITM	growth hormone inducible transmembrane protein	0.4866	6,21E+03	0.007400
HCC8	tumor antigen SLP-8p	-0.4393	6,21E+03	0.007450
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0.2114	4,89E+03	0.007500
COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	0.2092	1,50E+04	0.007600
TIA1	cytotoxic granule-associated RNA binding protein	-0.3175	4,89E+03	0.007600
PFKFB4	phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	-0.3958	2,48E+04	0.007950
CDR2	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa	-0.3257	1,50E+04	0.008000
SLC4A2	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2 (erythrocyte membrane protein band 3-like 1)	-0.27	1,85E+04	0.008750
ITGA6	integrin, alpha 6	-10.649	6,97E+03	0.008800
GPR34	protein-coupled receptor 34	-0.3404	8,76E+03	0.009300
FLJ20558	hypothetical protein FLJ20558	-0.2888	7,82E+03	0.009400
DUSP18	dual specificity phosphatase 18	0.1035	1,36E+04	0.009450
TEX27	testis expressed sequence 27	-0.245	9,80E+03	0.009750
TMF1	TATA element modulatory factor 1	-0.2096	1,22E+04	0.009800
DQX1	DEAQ RNA-dependent ATPase DQX1	-0.1543	8,51E+02	0.009950
TRIM9	tripartite motif-containing 9	-0.1696	2,28E+03	0.010150
LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	-0.276	2,48E+04	0.010850
NANS	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	0.6219	2,48E+04	0.010950
FLJ20287	hypothetical protein FLJ20287	0.1371	6,97E+03	0.011000
Hs.61638	gnl UG Hs	-0.6082	7,82E+03	0.011200
DKFZp434G0522	hypothetical protein DKFZp434G0522	0.1939	6,21E+03	0.011350
KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	-0.5161	8,76E+03	0.011400
KIAA0193	KIAA0193 gene product	-0.5871	1,09E+04	0.011550

Hs.330716	Homo sapiens mRNA, 3'UTR, up-regulated by BCG-CWS.	-0.3439	1,67E+04	0.011700
MFN2	mitofusín 2	0.3425	3,82E+03	0.011800
EPB41L2	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	-0.3593	3,82E+03	0.011800
AHCYL1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	0.1897	7,82E+03	0.011900
STX3A	syntaxín 3A	-0.3034	3,00E+04	0.012450
WDR7	WD repeat domain 7	0.1473	1,22E+04	0.012600
DKK4	dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis)	-0.1602	2,04E+04	0.012800
ATP9B	ATPase, Class II, type 9B	0.1333	6,97E+03	0.012900
LTF	Lactotransferrín	16.573	6,97E+03	0.013150
CCT7	chaperonín containing TCP1, subunit 7 (eta)	-0.3296	1,36E+04	0.013450
NUP98	nucleoporín 98kDa	-0.2859	9,80E+03	0.013700
IAN4L1	immune associated nucleotide 4 like 1 (mouse)	0.6556	9,80E+03	0.013700
NMA	putative transmembrane protein	-0.9406	1,67E+04	0.014050
SDCCAG10	serologically defined colon cancer antigen 10	0.7134	1,36E+04	0.014600
Hs.278611	gnl UG Hs	-0.6268	1,67E+04	0.014600
LOC92906	hypothetical protein BC008217	-0.4158	1,09E+04	0.014750
FXD5	FXD domain containing ion transport regulator 5	-0.5901	2,25E+04	0.014800
PLAU	plasminogen activator, urokinase	-0.9621	1,50E+04	0.015050
KIAA0870	KIAA0870 protein	0.4805	3,29E+04	0.015050
CLCA4	chloride channel, calcium activated, family member 4	0.8902	3,95E+04	0.015200

Tabela 4 - Trios de genes que separam pacientes respondedores de não respondedores com 100% de acerto. Os 4 trios estão ordenados por valores decrescentes de SVD.

trio	gene 1	gene 2	gene 3	SVD_R/NR ^(d)	CV ^(e)
1	ATP9B	KIAA1691	Hs.218008	10.926.178	35
2	FAD104	PPP1R9B	IFIT1	10.882.494	35
3	KDEL3	KIAA1691	TRIM9	10.684.677	35
4	LAMA3	KIAA0819	TRIM2	9.984.712	35

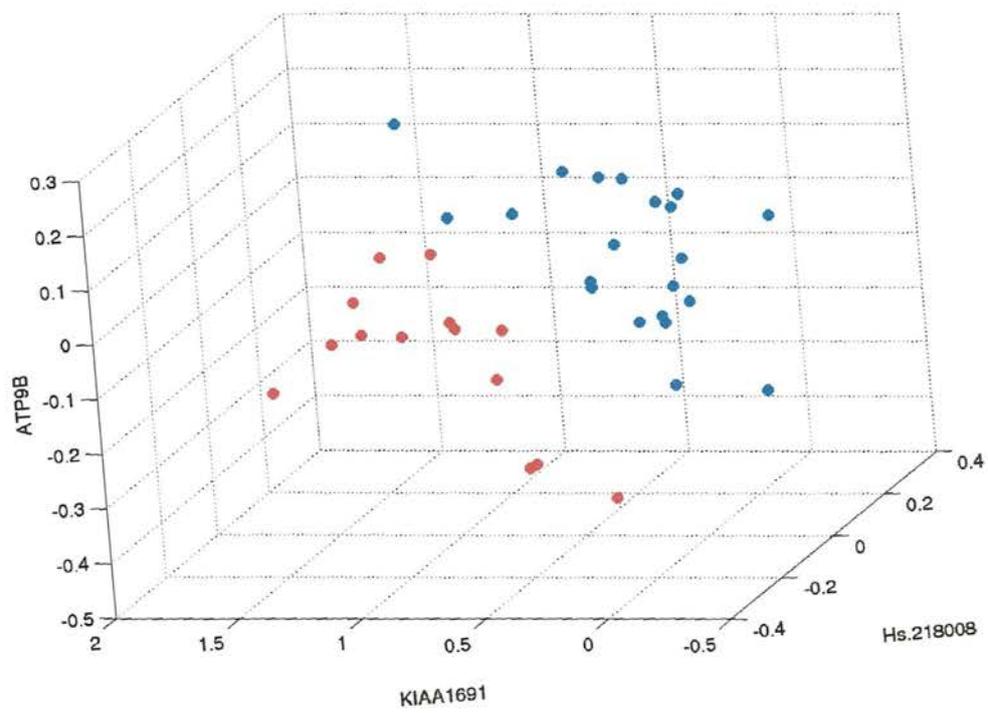
^(d)singular value decomposition ^(e)cross validation

Tabela 5 - Quadras de genes que separam pacientes respondedores de não respondedores com 100% de acerto. As 27 quadras estão ordenados por valores decrescentes de SVD.

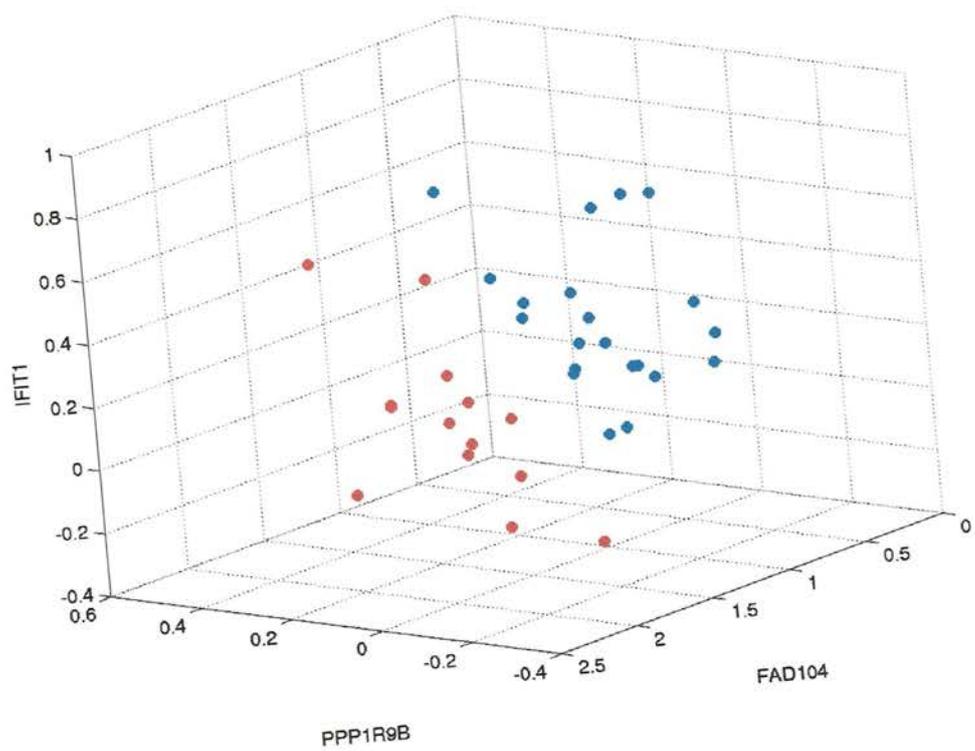
quadra	gene 1	gene 2	gene 3	gene 4	SVD_R/NR ^(d)	CV ^(e)
1	KIAA1691	TRIM9	ATP9B	Hs.218008	16.176.482	35
2	Hs.218008	KIAA1691	FLJ10648	CGBP	14.825.524	35
3	ZNF151	KIAA1691	TRIM9	ATP9B	14.762.159	35
4	ATP9B	KIAA1691	Hs.218008	GTF2H4	14.514.629	35
5	DFFA	KIAA1691	TRIM9	CDCA4	14.327.751	35
6	KIAA0819	KIAA1691	TRIM37	HLA-DOB	14.300.821	35
7	FAD104	PPP1R9B	IFIT1	FLJ20321	14.133.514	35
8	NOS3	KIAA1691	TRIM9	ATP9B	14.121.315	35
9	SMCY	TPT	C3AR1	C14orf130	13.830.300	35
10	DKK4	KIAA1691	HLA-DOB	CLASP2	13.769.018	35
11	KDEL3	KIAA1691	TRIM9	EIF2B3	13.661.398	35
12	Hs.289123	TRIM9	KIAA1691	ATP9B	13.536.825	35
13	DKFZP566C134	RALA	ITGB5	KIAA0095	13.191.716	35
14	Jade-1	KIAA1691	TRIM9	SCAMP-4	13.176.731	35
15	CGBP	KIAA1691	KIAA0819	TRIM37	13.149.591	35
16	SDCCAG10	ATP9B	TRIM9	KIAA1691	13.075.939	35
17	APP	DKFZP566C134	RBM12	PIGL	12.795.219	35
18	ATP5L	SMCY	AKAP10	DBT	12.769.785	35
19	DMTF1	KIAA1691	TRIM9	ATP9B	12.712.546	35
20	BBS2	KIAA1691	KIAA0335	ZDHC6	12.520.172	35
21	Hs.379757	KIAA1691	TRIM9	KDEL3	12.257.572	35
22	IAN4L1	KIAA1691	DKK4	ATP9B	12.233.770	35
23	AHCYL1	KIAA1691	TRIM9	DUSP18	12.210.576	35
24	ITGB5	SMCY	ATP9B	DKFZP434C171	12.197.861	35
25	DKFZP564O043	FAD104	KIAA1170	HMGCL	11.927.105	35
26	E2IG4	KIAA0819	KIAA1691	PP2135	11.690.288	35
27	FLJ12565	DKFZP434A1315	KLF8	WWP2	9.980.841	35

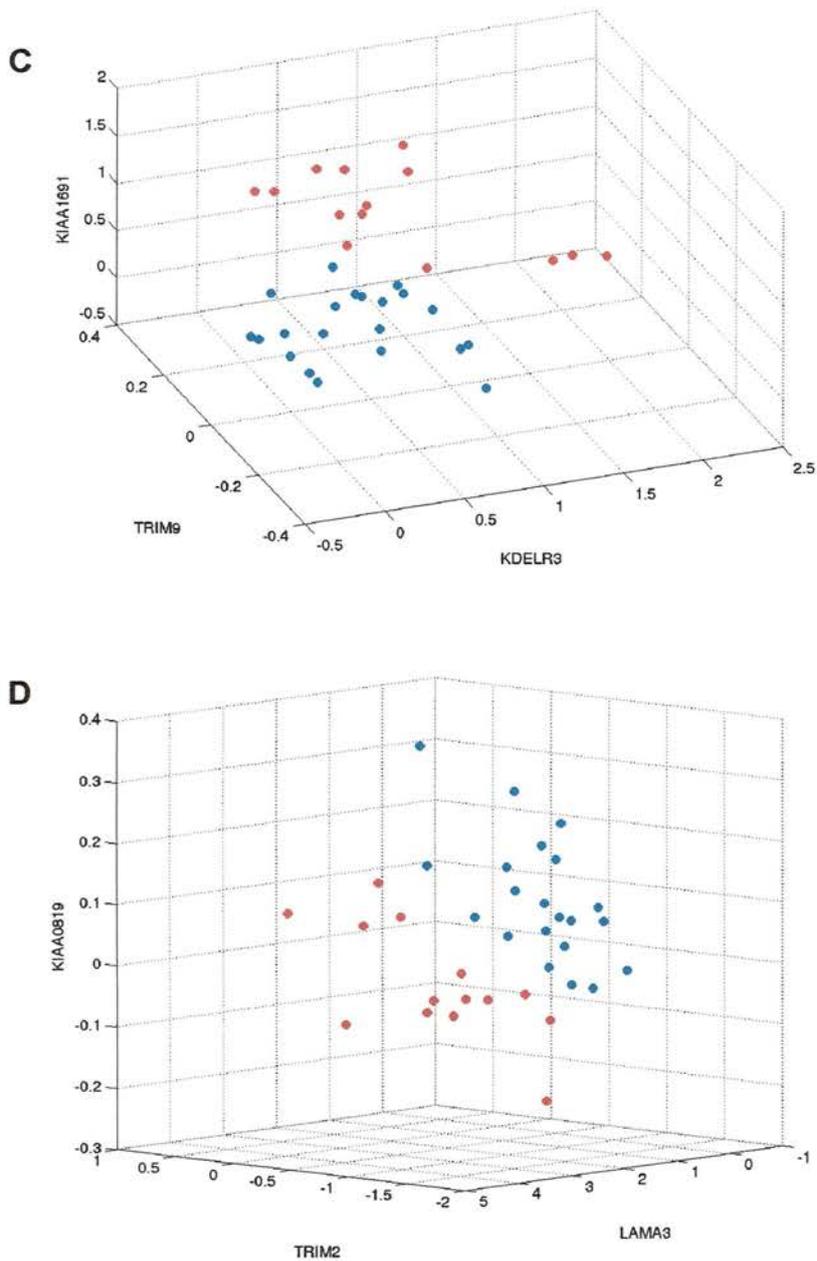
^(d)singular value decomposition ^(e)cross validation

A



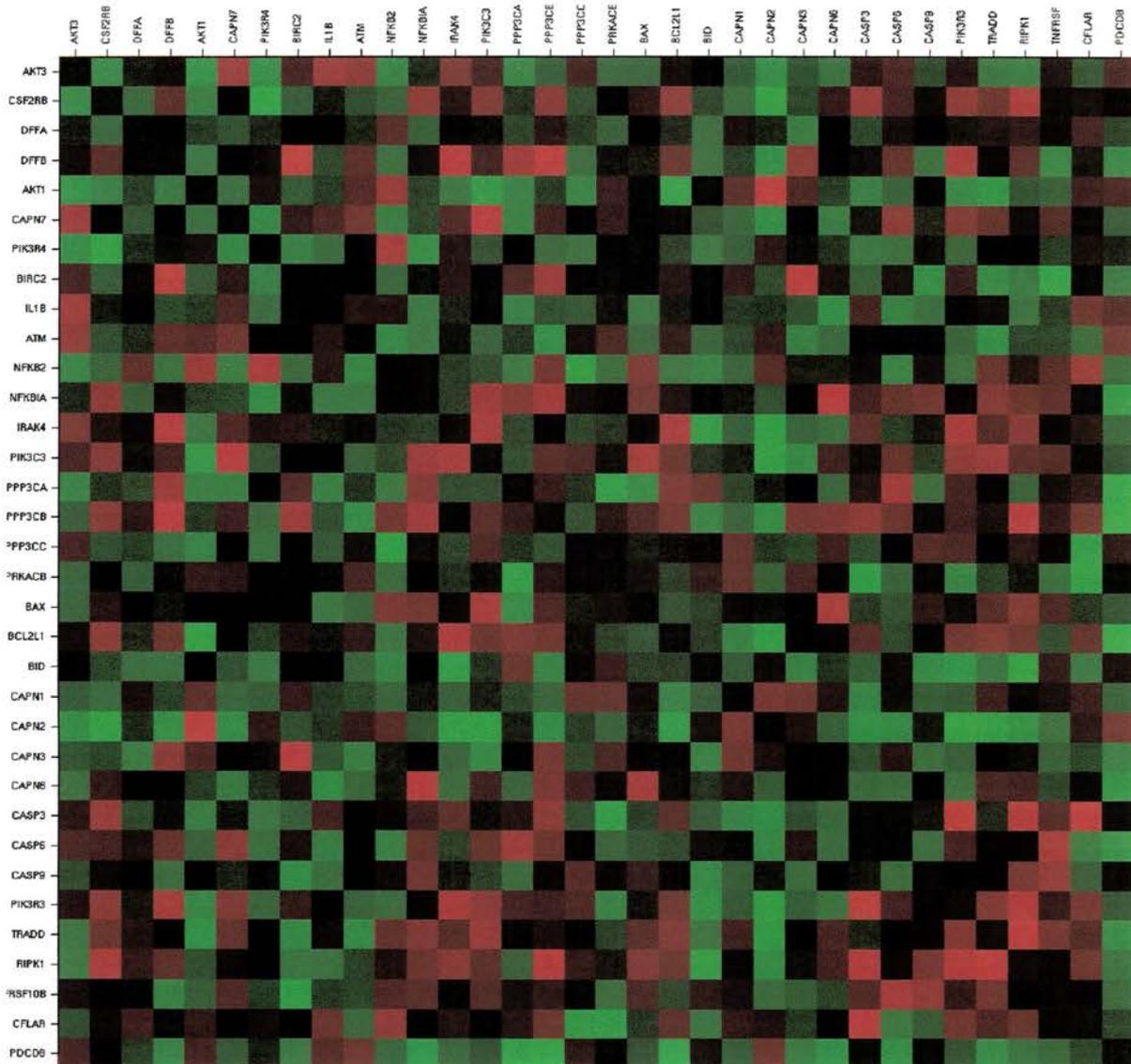
B





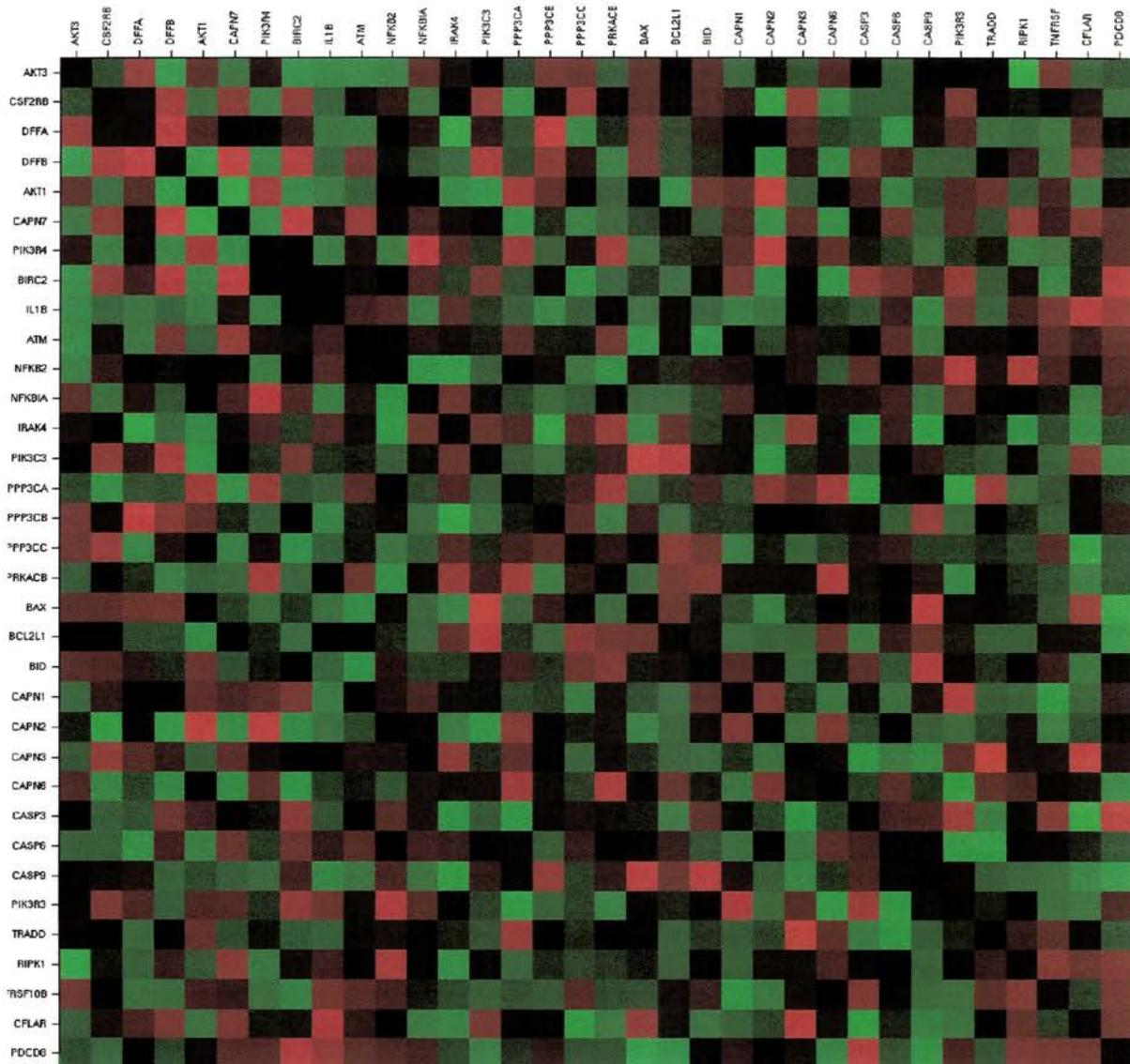
Legenda: Os conjuntos de 3 genes foram selecionados por Discriminador Linear de Fisher, pela capacidade de separar, com base nos níveis de expressão, as amostras de pacientes respondedores e não respondedores. Os painéis A-D representam os 4 trios ordenados por ordem decrescente de SVD. As amostras respondedoras estão representadas por esferas azuis e as não respondedoras por esferas vermelhas.

Figura 12 - Separação entre amostras respondedoras e não respondedoras por classificadores moleculares.



Legenda: Para cada par de gene foi determinada a correlação linear de Pearson. Correlação positiva (+1) está indicada em vermelho, negativa (-1) em verde e preto significa ausência de correlação entre os pares.

Figura 13 - Matriz de correlação entre pares de genes da via de apoptose dos pacientes respondedores.

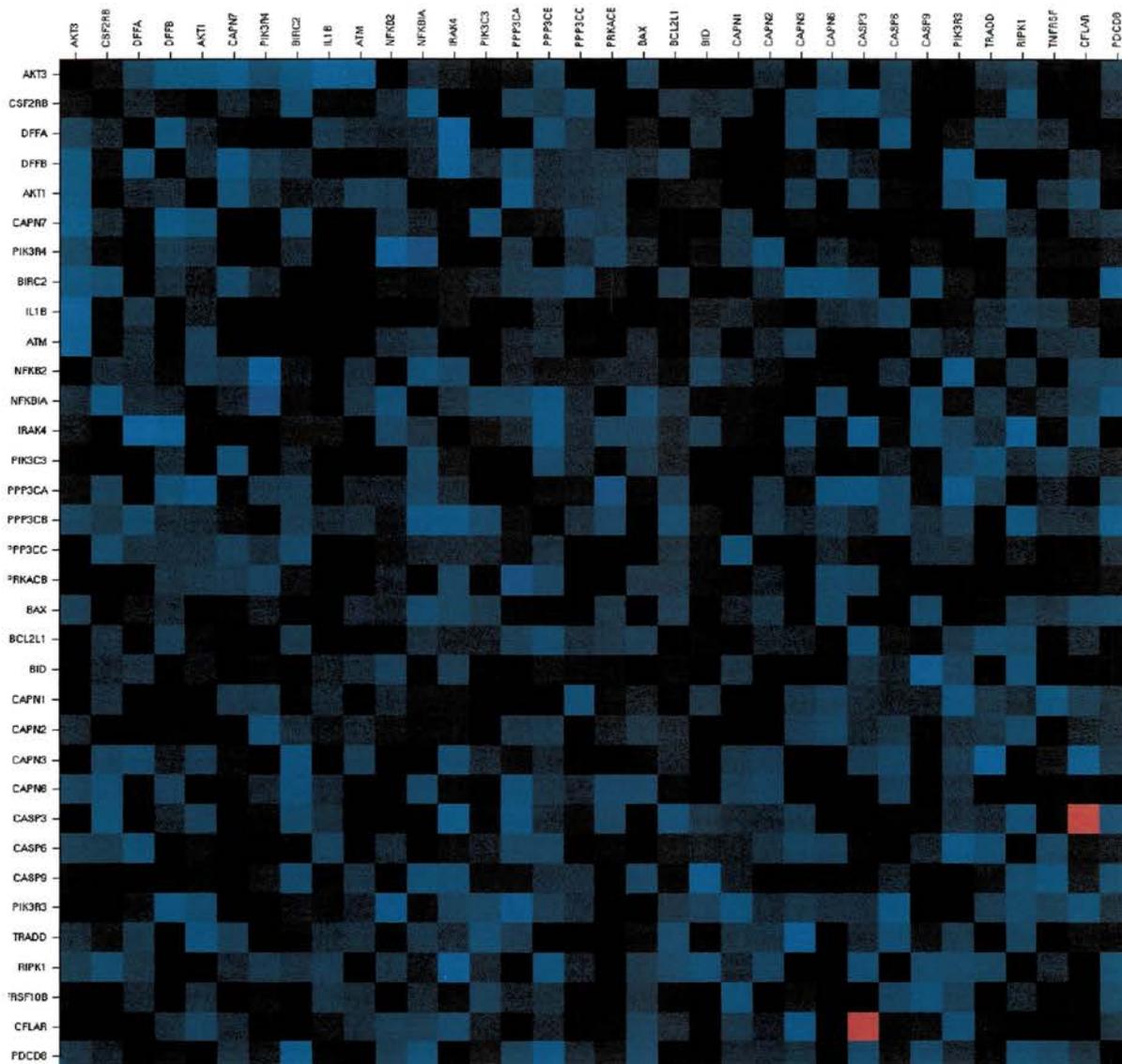


Legenda: Para cada par de gene foi determinada a correlação linear de Pearson. Correlação positiva (+1) está indicada em vermelho, negativa (-1) em verde e preto significa ausência de correlação entre os pares.

Figura 14 - Matriz de correlações entre pares de genes da via de apoptose dos pacientes não respondedores.

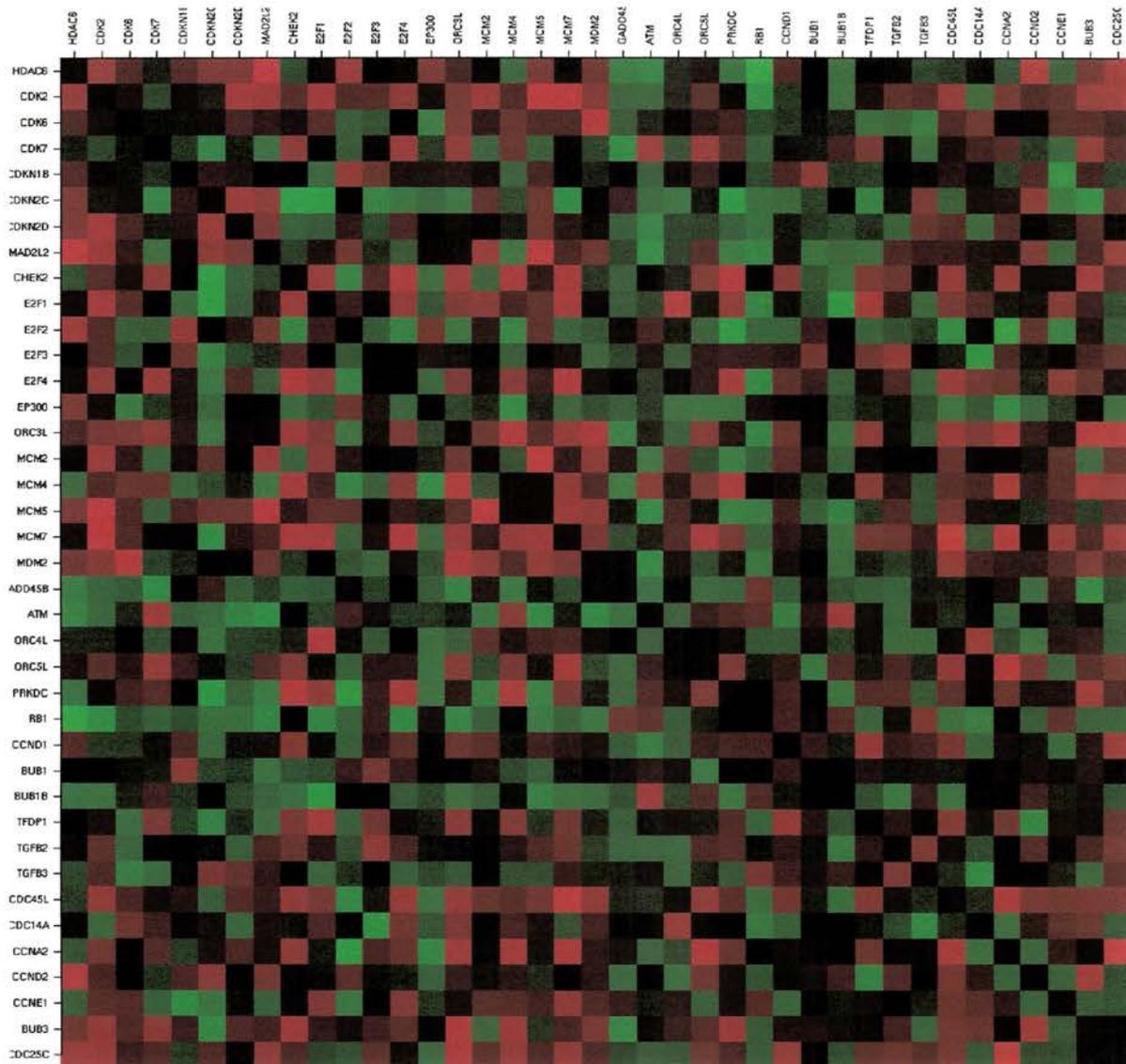
Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Instituidora Pós-Graduação



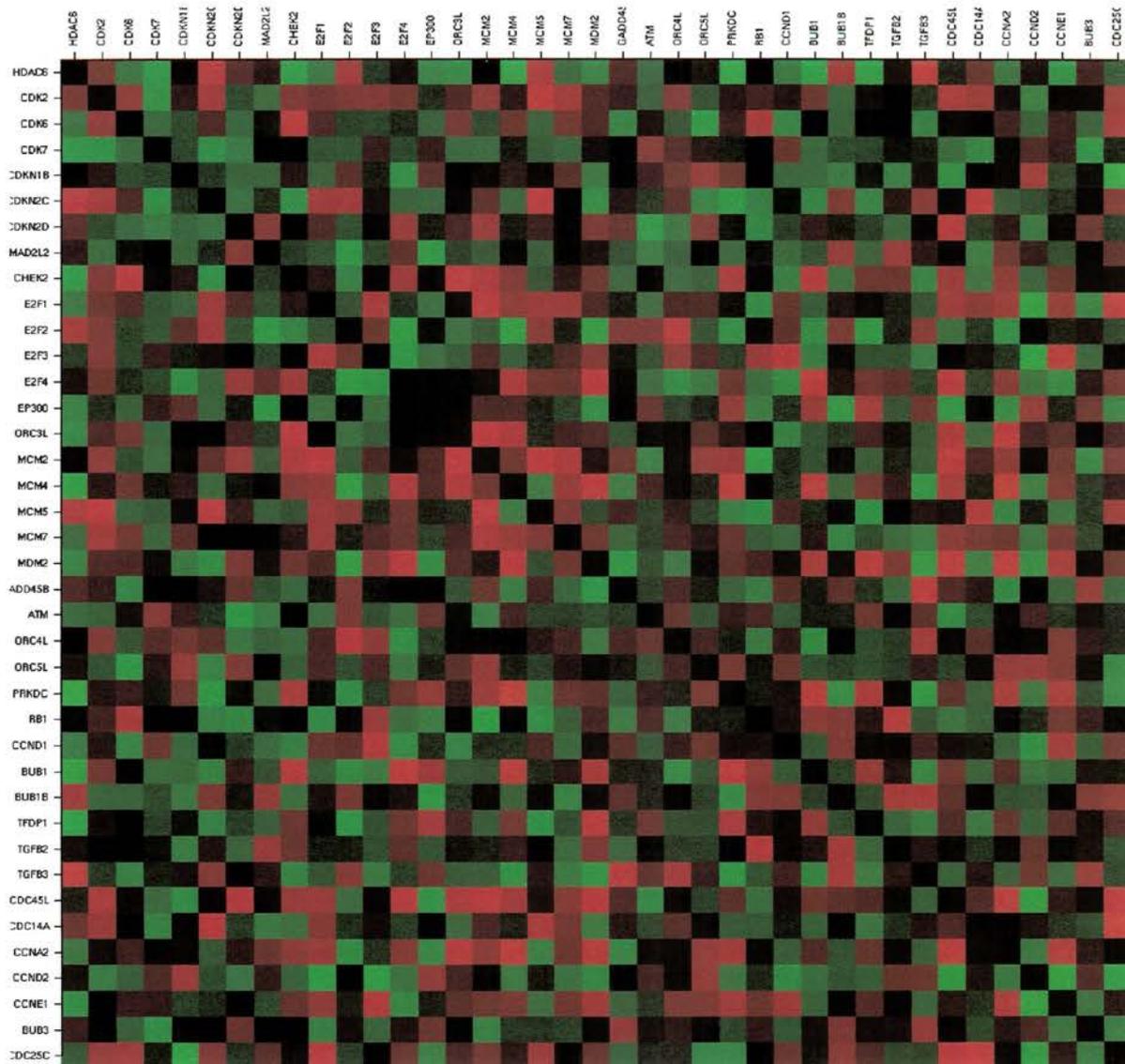
Legenda: Esta matriz representa a significância entre pares de genes desta via entre amostras respondedoras e não respondedoras. Para cada par de gene foram determinadas a diferença de correlação entre os dois grupos de pacientes e o valor estatístico desta diferença está representado em vermelho (+1), que indica as correlações mais significativas, passando pelo azul e chegando no preto (-1), que indica as correlações menos significativas.

Figura 15 - Matriz da diferença de correlação entre pares de genes da via de apoptose.



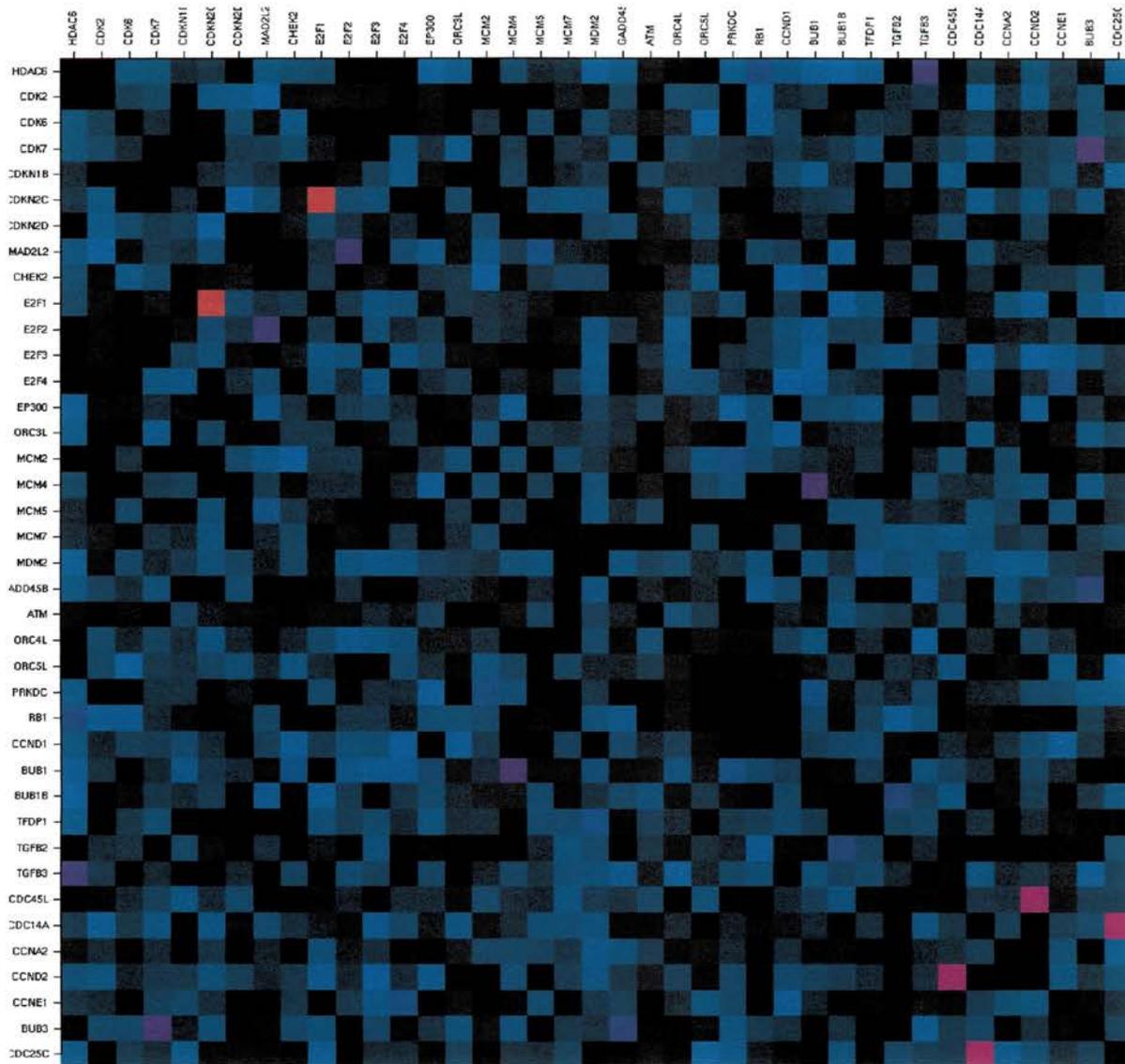
Legenda: Para cada par de gene foi determinada a correlação linear de Pearson. Correlação positiva (+1) está indicada em vermelho, negativa (-1) em verde e preto significa ausência de correlação entre os pares.

Figura 16 - Matriz de correlações entre pares de genes da via do ciclo celular dos pacientes respondedores.



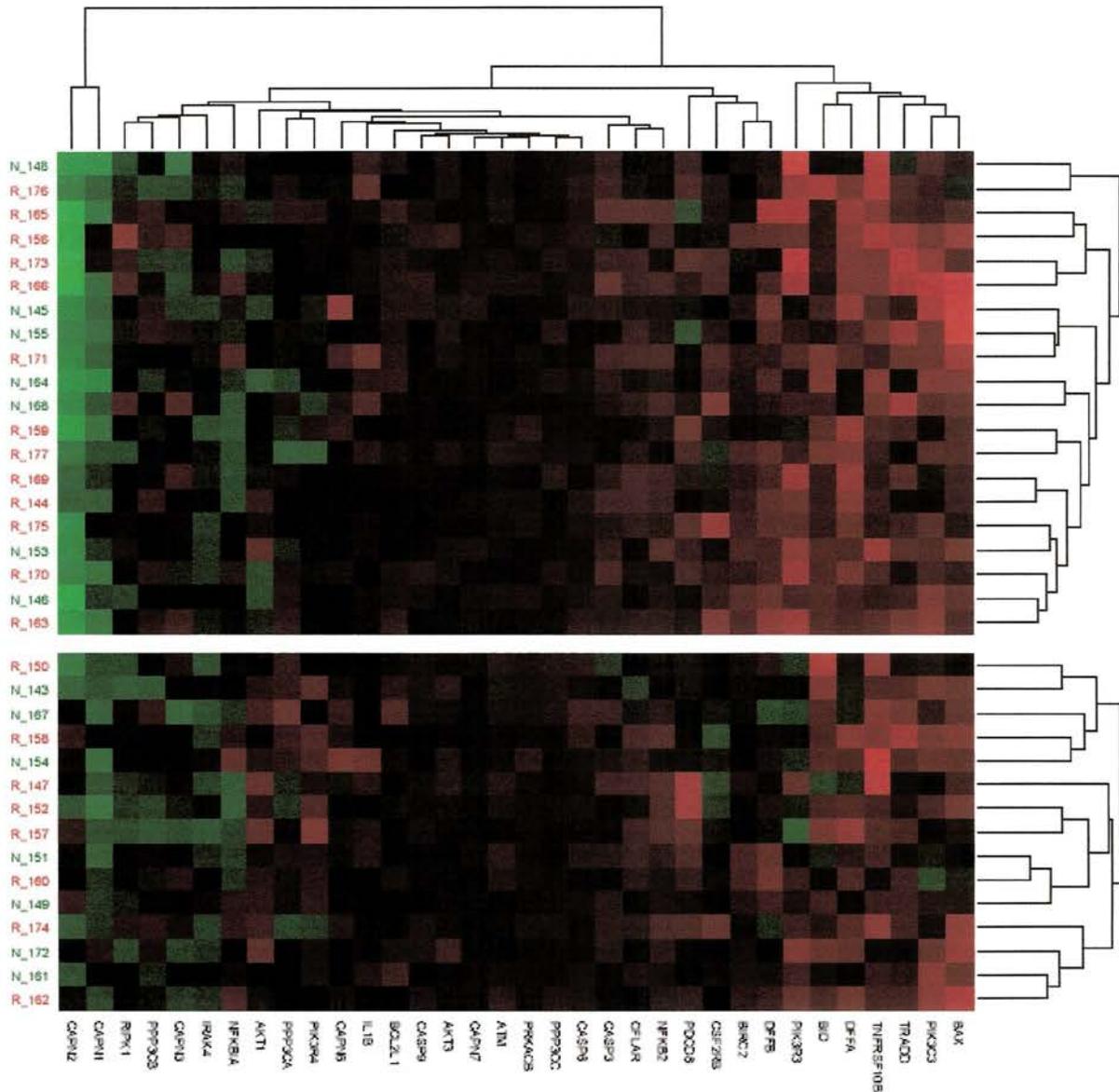
Legenda: Para cada par de gene foi determinada a correlação linear de Pearson. Correlação positiva (+1) está indicada em vermelho, negativa (-1) em verde e preto significa ausência de correlação entre os pares.

Figura 17 - Matriz de correlações entre pares de genes da via do ciclo celular dos pacientes não respondedores.



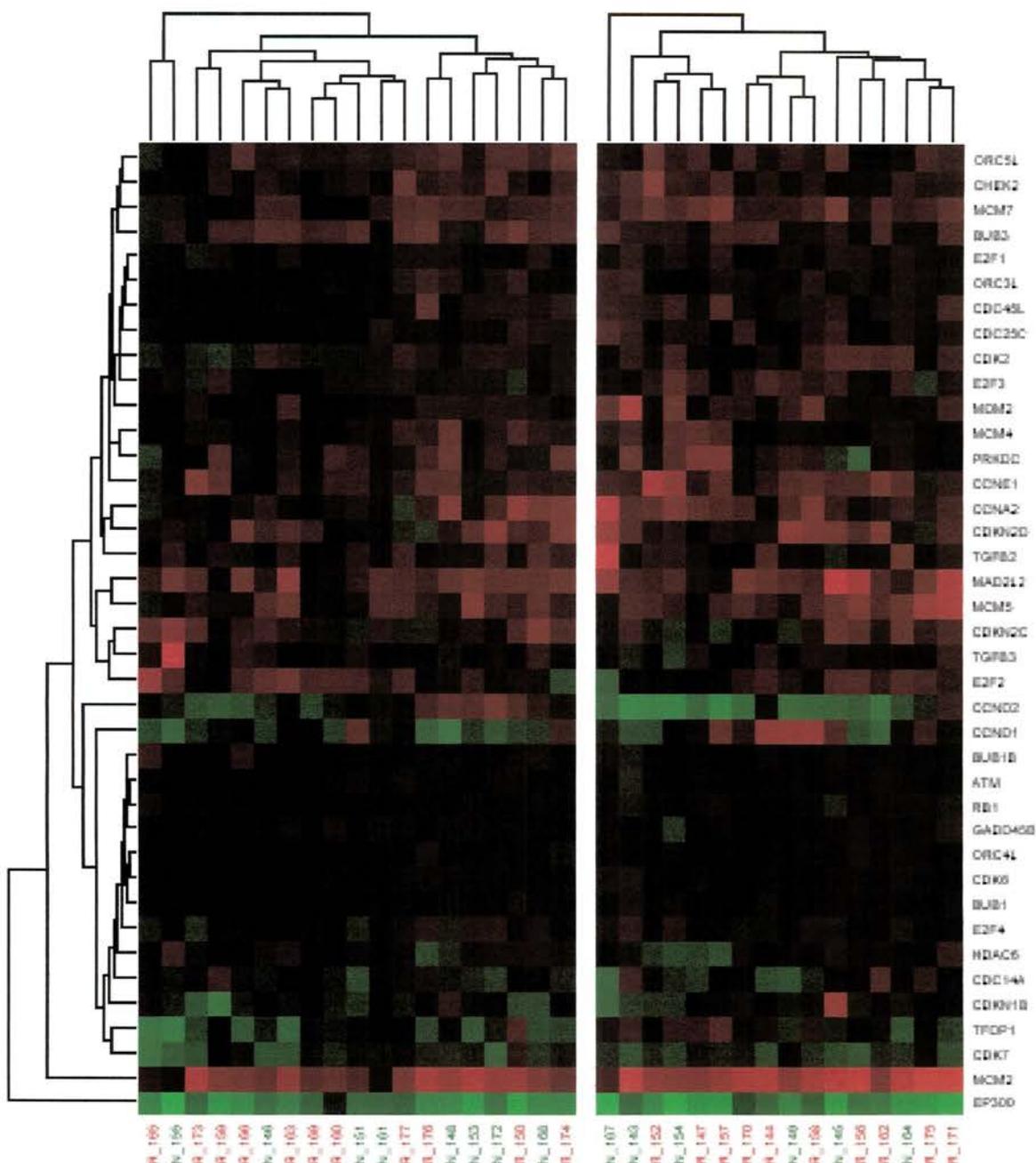
Legenda: Esta matriz representa a significância entre pares de genes desta via entre amostras respondedoras e não respondedoras. Para cada par de gene foram determinadas a diferença de correlação entre os dois grupos de pacientes e o valor estatístico desta diferença está representado em vermelho (+1), que indica as correlações mais significativas, passando pelo azul e chegando no preto (-1), que indica as correlações menos significativas.

Figura 18 - Matriz da diferença de correlação entre pares de genes da via do ciclo celular.



Legenda: As amostras dos pacientes R (em vermelho) e NR (em verde) foram agrupadas de maneira não supervisionada (Km2) em dois clusters. Em seguida, amostras e genes foram agrupados hierarquicamente por distância hierárquica. A cor verde denota expressão reduzida e a cor vermelha denota expressão aumentada dos genes em relação à expressão média dos 34 genes.

Figura 19 - Agrupamento das amostras de acordo com o perfil de expressão de 34 genes da via de apoptose.



Legenda: As amostras dos pacientes R (em vermelho) e NR (em verde) foram agrupadas de maneira não supervisionada (Km2) em dois clusters. Em seguida, amostras e genes foram agrupados hierarquicamente por distância hierárquica. A cor verde denota expressão reduzida e a cor vermelha denota expressão aumentada dos genes em relação à expressão média dos 39 genes.

Figura 20 - Agrupamento das amostras de acordo com o perfil de expressão de 39 genes da via do ciclo celular.

6 DISCUSSÃO

O câncer pode ser definido como a perda da homeostasia celular, conseqüência do acúmulo de mutações pelo DNA genômico de uma célula. Muito embora os eventos iniciais que eventualmente levam ao aparecimento do câncer parecem estar reduzido a um número restrito de genes, a manifestação clínica do câncer é bastante heterogênea, mesmo para tumores de uma mesma topologia. Esta heterogeneidade é conseqüência da variedade de mutações acumuladas pelas células tumorais após o início do processo de oncogênese. Assim sendo, tumores que acometem um mesmo órgão, com estágio clínico e aspecto histopatológico comparáveis se comportam de maneira distinta aos tratamentos, em decorrência das suas diferenças biológicas.

O tratamento de escolha para os casos de tumores localmente avançados é, na maioria das vezes, a retirada completa do órgão afetado, trazendo conseqüências funcionais e estéticas que comprometem a qualidade de vida do paciente. No caso dos tumores de laringe, as seqüelas funcionais mais observadas são problemas nos dentes, fala e deglutição. Assim sendo, protocolos de tratamento clínico que possam levar à preservação do órgão têm sido descritos.

Um desses protocolos foi realizado em 2003 e neste estudo um total de 518 pacientes com doença localmente avançada foram tratados de três formas diferentes e concluiu-se que o tratamento quimio-radioterápico concomitante é o melhor modo de preservar a laringe (FORASTIERE et al. 2003).

Em 1999, um ensaio clínico de fase II foi iniciado em nossa instituição com o objetivo de preservação de órgãos em CE localmente avançado de laringe e hipofaringe. O estudo se baseou na utilização de quimioterapia combinada de cisplatina e de paclitaxel nas doses de $20\text{mg}/\text{m}^2$ e $30\text{ mg}/\text{m}^2$ respectivamente, em associação com radioterapia na dose de 7040cGy em frações de $180\text{cGy}/\text{dia}$. O seguimento clínico dos 35 pacientes incluídos neste projeto variou de 3 a 5 anos e, ao final deste seguimento, 21 (60%) desses pacientes foram classificados como respondedores (R) e os 14 (40%) restantes foram classificados como não respondedores (NR).

Entre os 21 pacientes respondedores 6 apresentaram metástase à distância e 5 (23,8%) foram a óbito; já entre os 14 pacientes não respondedores o número de óbitos foi consideravelmente maior, acometendo 8 (57,14%) pacientes.

Realizando-se a somatória dos dois grupos de pacientes um total de 8 (22,85%) dos 35 iniciais foram a óbito devido à metástase à distância, mesmo após realizar quimioterapia. A sobrevida livre de doença dos pacientes respondedores em 5 anos é 71,4% e dos pacientes não respondedores em 2 anos é 0,0%. Esses valores demonstram que a grande maioria dos pacientes que responderam ao tratamento não foi acometida por doença local nem à distância; já nos pacientes não respondedores ocorreu um agravamento da doença culminado em óbito da totalidade.

Assim, os dados deste estudo (Olavo Feher, Tese de Doutorado, Fundação Antonio Prudente, em andamento) mostraram vantagens em realizar quimioterapia (cisplatina e paclitaxel) concomitante à radioterapia em uma parcela dos pacientes, os quais apresentaram preservação de órgãos e alta sobrevida global e livre de doença.

Um importante avanço na decisão de escolha de pacientes a serem submetidos ao tratamento de preservação seria a disponibilidade de marcadores que pudessem indicar, a priori, os pacientes que poderiam se beneficiar do tratamento clínico. Essa possibilidade teria importantes vantagens pois ocorreria um aumento na sobrevida global, uma melhora na qualidade de vida em geral, e ainda ocorreria uma redução na morbidade e custo de tratamento.

A metodologia de microarray tem sido largamente utilizada na tentativa de identificação de marcadores de prognóstico e preditores de resposta. Em um estudo envolvendo 295 pacientes com tumor de mama menor que 5 cm de diâmetro foi testado um painel de 70 genes, o qual se mostrou bom preditor de surgimento de metástase à distância durante os primeiros 5 anos de tratamento; demonstrando que este painel de genes poderia ser utilizado como critério para indicação de tratamento adjuvante com eventuais vantagens sobre os critérios atuais. Este painel foi construído com base no perfil de expressão gênica, através de microarray, e os genes são associados com o risco de metástase à distância em pacientes jovens e com tumor de mama linfonodo negativo (VAN DE VIJVER et al. 2002).

Até o presente momento não existem marcadores moleculares de predição de resposta ao tratamento quimio-radioterápico em pacientes portadores de CE localmente avançado de laringe e hipofaringe. Em geral, os estudos realizados se baseiam em duas linhas de pesquisa, realizando estudos clínicos que comparam o efeito de diferentes tratamentos em pacientes com câncer ou estudos de expressão gênica em culturas de células de CE de cabeça e pescoço, comparando linhagens resistentes e sensíveis a determinada droga quimioterápica.

O desenvolvimento de resistência à cisplatina ocorre em muitos pacientes, tornando-se um sério problema clínico. Os mecanismos moleculares pelo quais células cancerosas tornam-se resistentes a esta droga não é completamente entendido, apesar de várias hipóteses serem sugeridas (HIGUCHI et al. 2003).

Uma delas é a superexpressão de “ATP-binding cassette transporter”, responsável por uma bomba de efluxo, diminuindo a acumulação da droga nas linhagens resistentes (TANIGUCHI et al. 1996). Além disso, o aumento de reparo de DNA através da elevação dos níveis de enzimas de reparo (KRAKER et al. 1988) ou de proteínas ligantes de DNA que reconhecem danos no DNA (CHU e CHANG 1990) foram relatados em diversos casos de resistência de linhagens celulares à cisplatina.

Neste sentido, HIGUCHI et al. (2003) realizaram um estudo com linhagens celulares de CE de cabeça e pescoço sensíveis e resistentes à cisplatina. Através de cDNA microarray e confirmação por “display” diferencial foram encontrados 3 genes diferencialmente expressos; GPH α apresentou-se superexpresso nas linhagens resistentes e “folate receptor” e antígeno L6 subexpressos nas linhagens resistentes.

Uma análise multivariada realizada por CHO et al. (2004), em 123 pacientes com câncer de laringe (T1 a 2 N0) tratados com radioterapia, demonstrou através de “tissue” microarray que a expressão positiva da proteína COX-2, através de imunohistoquímica, é preditor de recorrência local após a radioterapia. Ciclooxygenase-2, proteína expressa em tecidos inflamados ou tumor, foi recentemente relatada como um potencial marcador prognóstico em CE (LIN et al. 2002). Mas, estudos realizados por RANELLETTI et al. (2001), com 61 pacientes com câncer de laringe tratados cirurgicamente e com radioterapia pós-operatória,

demonstraram resultados opostos. O autor verificou que a subexpressão de COX-2 foi preditor de pobre sobrevida livre de doença e pobre sobrevida global.

Neste trabalho, tivemos como objetivo principal a busca de marcadores moleculares que pudessem ser utilizados como preditores de resposta ao tratamento utilizado no ensaio clínico para preservação de laringe e hipofaringe realizado em nossa instituição. Para tanto, determinamos o perfil de expressão de 4.600 genes das amostras de biópsia coletadas previamente ao início do tratamento quimio-radioterápico.

Como esperado, esse conjunto de 35 amostras difere muito pouco entre si no que se refere ao perfil global dos genes avaliados, como demonstrado pela análise de agrupamento, ou cluster, hierárquico. Muito embora dois grandes grupos sejam formados, as amostras de pacientes respondedores e não respondedores se misturam nestes dois braços (figura 11).

Esta separação também não foi possível quando conjuntos de genes relacionados a uma mesma via funcional ou processo biológico foram selecionados. Foram realizados testes de agrupamento com genes representando 17 vias metabólicas distintas e, em nenhum dos casos, observamos uma separação precisa entre respondedores e não respondedores. Da mesma forma foi realizada uma busca na tentativa de se encontrar alguma via que separasse os pacientes em dois grupos, agora sem e com presença de metástase à distância, e, novamente, não foi encontrada nenhuma via que agrupasse os pacientes desta forma. As figuras 19 e 20 ilustram os grupamentos obtidos com as vias de apoptose e ciclo celular. Essas observações sugerem que, caso existam, o número de genes com expressão diferencial capaz de

gerar classificadores é reduzido e, não necessariamente, pertencem à mesma via metabólica ou processo biológico.

Para a identificação de marcadores moleculares para fins de diagnóstico e/ou prognóstico, várias metodologias tem sido utilizadas, baseadas tanto em métodos de agrupamento quanto de análise discriminatória.

Diferentes métodos de agrupamento, ou “clustering”, foram utilizados com sucesso para distinguir entre amostras tumorais e não tumorais (HIPPO et al. 2002); amostras morfológicamente similares (GOLUB et al. 1999; BOUSSIOUTAS et al. 2003) e determinar o prognóstico de doenças (VAN DE VIJVER et al. 2002; BEER et al. 2002).

Uma grande quantidade de métodos estatísticos estão disponíveis para realizar estas tarefas (QUACKENBUSH 2001). Estes métodos são normalmente baseados na expressão de um número grande de genes e, necessariamente, requerem dados de dois grupos de amostras para identificar um grupo de genes onde semelhanças e diferenças possam ser utilizadas para definir clusters (VAN DE VIJVER et al. 2002; ROEPMAN et al. 2005).

Esses pré-requisitos podem representar dificuldades potenciais no momento de serem rotineiramente aplicados. Uma alternativa seria a implementação de procedimentos de aprendizado supervisionado, no qual a classificação poderia ser baseada em assinaturas moleculares, características de uma amostra individual e não baseado no perfil de expressão comparado, como proposto por alguns estudos recentes (QUACKENBUSH 2001; RAMASWAMY et al. 2001; FUREY et al. 2000).

A maior vantagem desta implementação seria a possibilidade de criar um banco de dados contra o qual uma amostra desconhecida seria testada e classificada, como demonstrado por RAMASWAMY et al. (2001). Um grupo de amostras conhecidas poderia ser utilizado no “treinamento” e os classificadores resultantes utilizados para predição de amostras desconhecidas (predição de classe), como demonstrado por GOLUB et al. (1999).

Máquina de suporte vetorial (SVM), um exemplo de algoritmo de aprendizado supervisionado, foi utilizado com sucesso para distinguir 2 grupos de amostras por SHIPP et al. (2002) e por nosso grupo (MEIRELES et al. 2003). Vários outros métodos matemáticos como “Nearest Neighbor Classifiers” e árvores de classificação (DUDOIT et al. 2002a) também podem ser aplicados na busca de grupos de genes com padrões de expressão diferencial ou assinaturas moleculares.

Após alguns estudos, nos parece que a análise do tipo Discriminador Linear de Fisher (HASTIE et al. 2001) consegue manter uma boa relação entre facilidade e desempenho, tornando-se uma ótima escolha para este tipo de estudo. Além disso, esta abordagem de identificação de assinaturas de expressão corresponde à abordagem usual de identificar genes únicos diferencialmente expressos, com base na estatística T. A utilização do discriminador linear de Fisher foi descrita por Meireles et al. (2004) para a identificação de classificadores para diferentes doenças do estômago. Outro fator favorável à utilização deste método é que ele pode ser implementado para a busca seqüencial, que reduz o tempo de análise computacional em relação à busca exaustiva, e ainda permite a realização de testes “bootstrap” para se avaliar o significado estatístico destes classificadores (CRISTO 2003).

Neste trabalho, decidimos aplicar o Discriminador Linear de Fisher para identificar potenciais classificadores que possam predizer resposta ou não resposta ao tratamento utilizado. Como descrito em Material e Métodos, utilizamos a metodologia de busca seqüencial para identificar 100 trios formados a partir dos 100 genes mais diferencialmente expressos entre os dois grupos de amostras.

Em comparação com a metodologia de busca exaustiva esta estratégia tem a vantagem de ser factível com nossa capacidade computacional e ainda, de poder ser validada por metodologias de “bootstrap”. De fato, esta validação foi demonstrada por Eleir (CRISTO 2003) que validou os classificadores descritos por MEIRELES et al. (2004) realizando 10.000 simulações com “sets” aleatórios de 100 genes e, em nenhuma das simulações, encontrou um trio que tivesse melhor poder de classificação do que os 100 trios descritos pela busca seqüencial.

Na primeira etapa da nossa busca, selecionamos os 100 genes com menor p-valor (Mann-Whitney) quando amostras de pacientes respondedores e não respondedores foram comparadas (tabela 3).

Dentre os genes diferencialmente expressos, encontramos DFFA, (“DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide”), o oitavo gene mais diferencialmente expresso da lista (tabela 3). Este gene se apresentou superexpresso nos pacientes respondedores; sabe-se que o mesmo é substrato para caspase-3 e desencadeia a fragmentação do DNA durante a apoptose. A superexpressão do receptor HER-2 ocorre em 30% dos cânceres de mama e 20% dos de ovário, no sentido de entender melhor os eventos moleculares associados com a superexpressão deste gene foi realizado um estudo que demonstrou que DFFA está superexpresso nas células de câncer de mama humano que superexpressam HER-2 (OH et al. 1999).

Em nosso estudo o fato deste gene apresentar-se superexpresso nos pacientes respondedores pode ser um dos motivos que explique a sensibilidade às drogas quimioterápicas e à radioterapia, já que as células deste grupo entram em apoptose com maior frequência que do grupo de não respondedores.

Outro gene diferencialmente expresso foi SNAI2, (“snail homolog 2”), que se mostrou ser o nono gene mais diferencialmente expresso. A diferença em relação ao anterior é que este gene está superexpresso nos pacientes não respondedores.

Um estudo recente demonstrou que SNAI2 é um repressor potencial “in vivo” da expressão endógena de E-caderina em linhagens de mama (HAJRA et al. 2002). Sabe-se que E-caderina são moléculas de adesão célula-célula e sua perda de expressão é importante no desenvolvimento e progressão de carcinomas.

Mesotelioma maligno é um tipo de câncer altamente resistente à quimioterapia convencional e os mecanismos moleculares não são claros. Um grupo de pesquisadores demonstrou que linhagens de mesotelioma maligno multi-drogas resistentes expressam altos níveis de mRNA de SNAI2, e ainda que seu “knockdown” através de RNA interferência sensibilizou essas células à apoptose induzida por diferentes quimioterápicos, inclusive por cisplatina. Como finalização foi realizada transfecção deste gene em células parentais de mesotelioma maligno, ocorrendo o aumento da resistência à agentes quimioterápicos (CATALANO et al. 2004).

A expressão aberrante de SNAI2 tem sido correlacionada com a capacidade de crescimento invasivo em cânceres humano, devido à sua capacidade de reprimir a transcrição de moléculas envolvidas na adesão normal célula-célula, como E-caderina, “occludin” e “claudins”. Foram investigados os mecanismos moleculares

da expressão exógena deste fator em células de câncer humano, e descobriu-se que sua expressão aberrante ocasionou mudanças na morfologia celular, perda do contato normal célula-célula e ainda adquiriu propriedades de crescimento invasivo. Além disso, ocorreu resistência à morte celular programada desencadeada por danos no DNA. Análises moleculares detalhadas demonstraram que vários fatores importantes na morte celular programada estavam reprimidos. A depleção de SNAI2 endógeno através de RNA interferência levou ao aumento da sensibilidade de danos ao DNA acompanhado do aumento de fatores pró apoptóticos (KAJITA et al. 2004).

No prosseguimento de busca dos classificadores, 100 genes foram utilizados para a identificação dos 100 pares com melhor poder de classificação e estes foram utilizados para a identificação dos 100 trios e 100 quadras, respectivamente. Ao final da busca seqüencial, identificamos 4 trios e 27 quadras de genes com 100% de acerto na classificação das amostras. Porém, uma etapa fundamental para a validação destes classificadores seria a sua utilização em um conjunto independente de amostras (RANSOHOFF 2004 e 2005).

No entanto, como nosso conjunto de amostras foi proveniente de um ensaio clínico, não há disponibilidade de um segundo conjunto de amostras independentes, sem antes a realização de um segundo estudo clínico com novo seguimento por mais 5 anos. Assim, para que pudéssemos dar algum peso de significância aos classificadores aqui descritos, realizamos o teste de “leave-one-out”, ou validação cruzada, onde o processo de classificação das amostras foi repetido por 35 vezes sendo que, em cada um dos testes, uma das 35 amostras foi deixada de fora do processo de determinação da regra do classificador e a 35ª amostra foi usada como validação. Todos os 4 trios e 27 quadras acertaram em 100% dos testes realizados.

Com base nestes classificadores e nos dados clínicos, construímos curvas de sobrevivência para os 35 pacientes do estudo (figuras 2 e 3). É importante ressaltar que a curva que representa a sobrevida global dos pacientes não respondedores, apresentada na figura 2, está “contaminada” por 10 pacientes que foram submetidos à cirurgia de resgate e 6 desses estão vivos e livres de doença. Esses 6 pacientes estão vivos e livres de doença devido ao procedimento cirúrgico, e não ao tratamento quimio-radioterápico. Deste modo, a curva de sobrevida livre de doença apresentada na figura 3, calculada pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank, é a curva que melhor representa a realidade desses dados.

Assim sendo, a curva de sobrevida livre de doença torna-se mais importante que a de sobrevida global neste estudo. A sobrevida livre de doença dos pacientes respondedores em 5 anos é 71,4% (95% IC: 47,2%-86,0) e dos pacientes não respondedores em 2 anos é 0,0%.

Finalmente, realizamos uma busca de genes cujo padrão de expressão mostrasse diferenças em sua correlação linear de Pearson, quando amostras de pacientes respondedores e não respondedores fossem comparadas. O objetivo desta análise é a identificação de genes cuja mudança de comportamento possa contribuir para o entendimento do mecanismo relacionado à resposta ou não ao tratamento. Para esta busca utilizamos genes pertencentes a diversas vias metabólicas já conhecidas (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Assim, foram geradas 3 matrizes para cada via metabólica, uma representando a correlação nos pacientes respondedores, uma representando a correlação nos pacientes não respondedores e uma última, representando a significância estatística das mudanças observadas entre os dois grupos.

A via da apoptose nos parece importante para o fenômeno em estudo já que os pacientes que respondem ao tratamento provavelmente possuem células tumorais que entram em apoptose com maior frequência que os não respondedores. Nas figuras 13 e 14 temos as correlações para todos os genes desta via representados em nosso array, na figura 15, podemos identificar as alterações estatisticamente significativas.

Na via da apoptose o par de genes CFLAR (“CASP8 and FADD-like apoptosis regulator”), pode apresentar função anti-apoptótica ou pró-apoptótica e CASP3 (“caspase 3, apoptosis-related cysteine protease”), com função pró-apoptótica, apresentam forte correlação linear de Pearson positiva nos pacientes respondedores (figura 13) e forte correlação linear negativa nos pacientes não respondedores (figura 14). Este par de genes apresentou a correlação mais significativa entre todas as comparações testadas da via de apoptose entre os dois grupos de pacientes (figura 15).

Nossos dados demonstram que no grupo de pacientes respondedores a expressão de CASP3 e de CFLAR aumentam; enquanto que nos pacientes não respondedores a expressão do gene CASP3 aumenta e a expressão de CFLAR diminui. Conseqüentemente, podemos concluir que nos pacientes respondedores o transcrito do gene CFLAR apresenta função pró-apoptótica, culminando em maior quantidade de morte das células tumorais. Já nos pacientes não respondedores a função deste transcrito é anti-apoptótica, ocorrendo um número muito menor de morte de células tumorais quando comparado aos pacientes respondedores.

Outra via que achamos importante estudar e correlacionar com o fato de haver resposta ao tratamento por alguns pacientes e outros não foi a via do ciclo

celular, e nesta via encontramos o par de genes E2F1 (E2F transcription factor 1”), fator de transcrição e ativador de genes que levam a célula da fase G1 a S, e CDKN2C (“cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4”), inibidor da proliferação celular, ligados por forte correlação linear negativa nos pacientes respondedores (figura 16) e forte correlação positiva nos pacientes não respondedores (figura 17). Este par de genes foi o que apresentou a correlação mais significativa entre todos os genes da via do ciclo celular comparando-se os dois grupos de pacientes (figura 18).

Nossos dados demonstraram que conforme aumenta a expressão de E2F1 diminui a expressão de CDKN2C nos pacientes respondedores, resultando em maior número de divisões celulares, o que certamente leva à maior ação das drogas quimioterápicas cisplatina e paclitaxel, e da radioterapia. Já nos pacientes não respondedores a expressão de ambos os genes aumentam, resultando em menor proliferação celular e conseqüente menor ação da cisplatina, paclitaxel e da radioterapia.

Um estudo relacionado a esse par de genes demonstrou que o fator de transcrição E2F1 se liga no sítio promotor de CDKN2C, induzindo sua transcrição e causando posterior elevação dos níveis de mRNA de CDKN2C (BLAIS et al. 2002).

A vantagem da utilização da técnica de cDNA microarray é a capacidade de analisar centenas ou até mesmo milhares de genes simultaneamente. Mas talvez sua maior limitação seja o número limitado de genes “spotados” na lâmina, ocorrendo o risco de se perder algum gene diferencialmente expresso; além disso, os resultados podem ser muito diferentes entre estudos dependendo dos genes escolhidos para compor a lâmina, tornando difícil a comparação entre estudos distintos.

Nossa identificação dos 100 genes mais diferencialmente expressos requer inúmeros estudos posteriores, inclusive na elucidação de vários genes que ainda apresentam função pouco conhecida ou desconhecida. A partir dos dados gerados por microarray encontramos genes diferencialmente expressos; através do estudo futuro desses genes candidatos poderemos descobrir as causas de resistência do CE de laringe e hipofaringe ao tratamento realizado com cisplatina e paclitaxel concomitante à radioterapia, e mesmo em outros tipos de tumores. Podemos até mesmo ainda descobrir genes para serem utilizados como alvo terapêutico, através da inibição ou superexpressão do gene em questão.

Como objetivo principal deste estudo buscamos também definir perfis de expressão e alterações de correlação em genes que poderiam ser utilizados na construção de classificadores moleculares, a fim de distinguir pacientes portadores de CE localmente avançado de laringe e hipofaringe respondedores e não respondedores à quimioterapia (cisplatina e paclitaxel) concomitante à radioterapia. Neste estudo encontramos trios e quadras de genes que separam perfeitamente esses dois grupos de pacientes.

Desta forma, a partir dessas amostras seria possível prever quais os pacientes portadores de carcinoma epidermóide localmente avançado de laringe e hipofaringe iriam responder a este tratamento quimioterápico (cisplatina e paclitaxel) concomitante à radioterapia e quais não iriam responder, com base no seu perfil de expressão destes genes. Esta abordagem permite o encaminhamento dos pacientes para um tratamento de modo individualizado e eficaz.

A importância da descoberta destes classificadores é que, futuramente, poderá ser criado um banco de dados e uma amostra desconhecida poderá ser testada e

classificada em relação a estes dois grupos de pacientes (respondedores e não respondedores), previamente ao início do tratamento. Deste modo, o paciente poderá ser direcionado para o melhor tratamento possível; encaminhando os pacientes respondedores para um tratamento conservador que consiste em quimio-radioterapia e encaminhando os não respondedores para cirurgia radical convencional e radioterapia pós-operatória.

Como consequência deste estudo poderão ser evitadas cirurgias e mutilações desnecessárias, minimizando complicações, custos e toxicidade devido ao tratamento, aumentando a expectativa e qualidade de vida. Em continuidade a este trabalho é necessário testar esses classificadores em outro conjunto de amostras e avaliar se os mesmos são aplicáveis para qualquer amostra da população. Finalmente, validando-se essa ferramenta de prognóstico molecular será possível contribuir significativamente para o tratamento eficaz do câncer.

Estudos posteriores explorando os genes que apresentaram correlação linear alterada quando os dois grupos de pacientes foram comparados neste estudo poderá contribuir para o entendimento da biologia tumoral das células respondedoras e não respondedoras, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de ação das drogas e dos mecanismos de resistência. Mas, é importante notar que a análise e compreensão desses dados são delicados uma vez que nem toda correlação encontrada pelas matrizes necessariamente significa uma interação verdadeira ou significativa do ponto de vista biológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts JA, Watson JD. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing; 1994. Cancer; p.1255-94.

Barbosa JF. **Câncer da faringe**. São Paulo: Editora Manole; 1979. Câncer da hipofaringe; 157-86.

Bataini P, Brugere J, Bernier J, Jaulerry CH, Picot C, Ghossein NA. Results of radical radiotherapeutic treatment of carcinoma of the pyriform sinus: experience of the Institut Curie. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1982; 8:1277-86.

Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med** 2002; 8:816-24.

Benjamin B, Bingham B, Hawke M, Stammberger H. **Atlas colorido de otorrinolaringologia**. São Paulo: Artes Médicas; 1996. A laringe; p.223-305.

Blais A, Monte D, Pouliot F, Labrie C. Regulation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c by the transcription factors E2F1 and Sp1. **J Biol Chem** 2002; 277:31679-93.

Boussioutas A, Li H, Liu J, et al. Distinctive patterns of gene expression in premalignant gastric mucosa and gastric cancer. **Cancer Res** 2003; 63:2569-77.

Brazma A, Vilo J. Gene expression data analysis. **FEBS Lett** 2000; 480:17-24.

Byers RM, Wolf PF, Ballantyne AJ. Rationale for elective modified neck dissection. **Head Neck Surg** 1988; 10:160-7.

Carvalho AF, Neves EJ, Hirata R, Jr, Reis LF. Glass slide-based agarose gel electrophoresis for determining the efficiency of RNA amplification and cyanine dye incorporation during RNA labeling. **Biotechniques** 2003; 35:688-92.

Catalano A, Rodilossi S, Rippo MR, Caprari P, Procopio A. Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. **J Biol Chem** 2004; 279:46706-14.

Cho EI, Kowalski DP, Sasaki CT, Haffty BG. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of COX-2 expression for local relapse in T1-2N0 larynx cancer treated with primary radiation therapy. **Laryngoscope** 2004; 114:2001-8.

Chu G, Chang E. Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1990; 87:3324-7.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999. Neoplasia; p.260-327.

Cristo EB. **Métodos Estatísticos na Análise de Experimentos de Microarray**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Instituto de Matemática e Estatística-USP].

DeRisi J, Penland L, Brown PO, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. **Nat Genet** 1996; 14:457-60.

De Stefani E, Correa P, Oreggia F, et al. Risk factors for laryngeal cancer. **Cancer** 1987; 60:3087-91.

Dudoit S, Fridlyand J, Speed TP. Comparison of discrimination methods for the classification of tumors using gene expression data. **J Am Stat Assoc** 2002a; 457:77-87.

Dudoit S, Yang YH, Speed TP, Callow MJ. Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments. **Statistica Sinica** 2002b; 12:111-39.

Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:243-52.

Farinati F, Zhou Z, Bellah J, Lieber CS, Garro AJ. Effect of chronic ethanol consumption on activation of nitrosopyrrolidine to a mutagen by rat upper alimentary tract lung and hepatic tissue. **Drug Metab Dispos** 1985; 13:210-4.

Feher O, Martins SJ, Lima CA, Salvajoli JV, Simpson AJ, Kowalski LP. Pilot trial of concomitant chemotherapy with paclitaxel and split-course radiotherapy for very advanced squamous cell carcinoma of head and neck. **Head Neck** 2002a; 24:228-35.

Feher O, Valadares AD, Nicolau UR, et al. Paclitaxel and cisplatin concurrent with radiotherapy RT for larynx preservation in advanced resectable laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas SCC: preliminary results of a phase II study. **Proceedings ASCO** 2002b; 21:A962.

Feldman AL, Costouros NG, Wang E, et al. Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. **Biotechniques** 2002; 33:906-14.

Field JK, Malliri A, Butt SA. p53 overexpression in end stage squamous cell carcinoma of the head and neck: correlates with a very poor clinical out-come. **Int J Oncol** 1993a; 3:431-5.

Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1993b; 119:1118-22.

Fletcher GH, Lindberg RD, Hamberger A, Horiot JC. Reasons for irradiation failure in squamous cell carcinoma of the larynx. **Laryngoscope** 1975; 825:987-1003.

Fonseca CA, Otto SS, Paumgarten FJ, Leitão AC. Non-toxic mutagenic and clastogenic activities of Mate-Chimarrão (*Ilex Paraguariensis*). **J Environ Pathol Toxicol Oncol** 2000; 19:333-46.

Forastiere AA, Leong T, Rowinsky E, et al. Phase III comparison of high-dose paclitaxel + cisplatin + granulocyte colony-stimulating factor versus low-dose paclitaxel + cisplatin in advanced head and neck cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1393. **J Clin Oncol** 2001; 19:1088-95.

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:2091-8.

Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques** 2000; 29:1042-55.

Furey TS, Cristianini N, Duffy N, Bednarski DW, Schummer M, Haussler D. Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. **Bioinformatics** 2000; 16:906-14.

Garden AS, Harris J, Vokes EE, et al. results of Radiation Therapy Oncology Group 97-03: a randomized phase ii trial of concurrent radiation and chemotherapy for advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. **J Clin Oncol** 2004; 22:2856-64.

Garro AJ, Seitz HK, Lieber CS. Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. **Cancer Res** 1981; 41:120-4.

Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in subset of head and neck cancers. **Curr Opin Oncol** 2001; 13:183-8.

Gilman AG, Ruddon RW, Molinoff PB, Limbird LE, Hardman JG. Antineoplastic agents. In: Chabner B, Allegra C, Curt G, Calabresi P, editors. **Goodman e Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill; 1996. p.1233-87.

Globocan. **Cancer incidence mortality and prevalence 2002**. Lyon: IARC. Available from: <URL:htt://www-dep.iarc.fr/> [2005 jan 12].

Goldenberg D, Golz A, Joachims HZ. The beverage maté: a risk factor for cancer of the head and neck. **Head Neck** 2003; 25:595-601.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science** 1999; 286:531-7.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. **Cancer Res** 2002; 62:1613-8.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanna E, Shrieve DC, Ratanatharathorn V, et al. A novel alternative approach for prediction of radiation response of squamous cell carcinoma of head and neck. **Cancer Res** 2001; 61:2376-80.

Hanna E, Sherman A, Cash D, et al. Quality of life for patients following total laryngectomy vs chemoradiation for laryngeal preservation. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:875-9.

Harwood AR, Hawkins NV, Beale FN, Rider WD, Bryce DP. Management of advanced glottic cancer: A 10 year review of the Toronto experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1979; 5:899-904.

Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. **The elements of statistical learning**. New York: Springer-Verlag; 2001.

Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, et al. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. **Cancer Res** 2002; 62:233-40.

Hoffmann D, Melkian A, Adams JD, Brunnemann ND, Haley ND. New aspects of tobacco carcinogenesis. **Carcinogenesis** 1985; 8:239-56.

Hoffman HT, Kamell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The national cancer data base report on cancer of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1998; 124:951-62.

Hsu TC. Alcohol: a cocarcinogen in head and neck malignancies. **Adv Exp Med Biol** 1992; 320:35-7.

Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Res** 1994; 22:5640-8.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer Statistics 2004. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:8-29.

Kajita M, McClinic KN, Wade PA. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. **Mol Cell Biol** 2004; 24:7559-66.

Keane TJ, Hawkins NV, Beale FA, et al. Carcinoma of the hypopharynx results of primary radical radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1983; 9:659-64.

Kearns CM, Gianni L, Egorim MJ. Paclitaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Semin Oncol** 1995; 22:16-23.

Kissin B, Kaley MM. Alcohol and cancer. In: Kissin B, Begleiter H, editors. **The biology of alcoholism**. New York: Plenum Press; 1974. p.481-511.

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

Kraker AJ, Moore CW. Elevated DNA polymerase beta activity in a cis-diamminedichloroplatinum(II) resistant P388 murine leukemia cell line. **Cancer Lett** 1988 ; 38:307-14.

Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? **Nat Rev Cancer** 2001; 1:151-7.

Lakhani SR, O'Hare MJ, Asworth A. Profiling familial breast cancer. **Nat Med** 2001; 7:408-10.

Lee SW, Tomassetto C, Sanger R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:2825-9.

Lennon GG, Lehrach H. Hibridization analyses of arrayed cDNA libraries. **Trends Genet** 1991; 7:314-7.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. **Science** 1992; 257:967-70.

Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. **Head Neck** 2002; 24:792-9.

Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. **Cancer** 1972; 29:1146-9.

Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissman L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas leukoplakias and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. **Invest Dermatol** 1985; 84:417-20.

Macoska JA. The progressing clinical utility of DNA microarrays. **CA Cancer J Clin** 2002; 52:50-59.

Maier H, Born IA, Veith S, Adler D, Seitz HK. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. **Alcoholism Clin Exp Res** 1986; 10:420-7.

Maier H, Born IA, Mall G. Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. **Klin Wochenschr** 1988; 66:140-50.

Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. **Clin Invest** 1992; 70:320-7.

Marx J. DNA arrays reveal cancer in its many forms. **Science** 2000; 289:1670-2.

Matos de Sá G. Tratamento das cadeias linfáticas no câncer da laringe. In: Noronha MJR, Dias FL, editores. **Câncer da laringe: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Revinter; 1997. p.227-32.

Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. **Cancer Res** 2003; 63:1920-6.

Meireles SI, Carvalho AF, Hirata R, Jr, et al. Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array. **Cancer Lett** 2003; 190:199-211.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Mendenhall WM, Parsons JT, Devine JW, Cassisi NJ, Million RR. Squamous cell carcinoma of the pyriform sinus treated with surgery and/or radiotherapy. **Head Neck Surg** 1987; 10:88-92.

Mendenhall WM, Parsons JT, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR. Carcinoma of the supraglottic larynx: a basis for comparing the results of radiotherapy and surgery. **Head Neck** 1990; 12:204-9.

Mendenhall WM, Parsons JT, Mancuso AA, Stringer SP, Cassisi NJ. Radiotherapy for squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx: an alternative to surgery. **Head Neck** 1996; 18:24-35.

Mendez P, Maves MD, Panje WR. Squamous cell carcinoma of the head and neck in patients under 40 years of age. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1985; 111:762-4.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mufti SJ, Lieber CS, Garro AJ. Effect of chronic ethanol consumption on the extend and persistence of DMN-induced DNA-alkylation [abstract]. **Cancer Res** 1981; 21:58.

Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. **Cancer** 1995; 75:147-53.

Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2000; 122:44-51.

Oh JJ, Grosshans DR, Wong SG, Slamon DJ. Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. **Nucleic Acids Res** 1999; 27:4008-17.

Oliveira CAB, Valle HA, Monteiro GBM, et al. Patologia das neoplasias da laringe. In: Noronha MJR, Dias FL, editores. **Câncer da Laringe: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Revinter; 1997. p.8-14.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 1990; 49:33-64.

Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:5022-6.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data MACH-NC Collaborative Group Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. **Lancet** 2000; 355:949-55.

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. **Nat Rev Genet** 2001; 2:418-27.

Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:15149-54.

Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. **J Clin Oncol** 2002; 20:1932-41.

Ranelletti FO, Almadori G, Rocca B, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2001 95:343-9.

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

Ransohoff DF. Opinion: Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:142-9.

Raybaud-Diogène H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Têtu B. Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. **J Clin Oncol** 1997; 15:1030-8.

Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3187-92.

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

Rose WC. Taxol: a review of its preclinical in vivo antitumor activity. **Anticancer Drugs** 1992; 3:311-21.

Rosenberg B. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. **Naturwissenschaften** 1973; 60:399-406.

Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG. Taxol: the first of the taxanes an important new class of antitumor agents. **Semin Oncol** 1992; 19:646-62.

Rowinsky EK, McGuire WP, Donehower RC. The current status of Taxol. **Print Pract Gynecol Oncol Updates** 1993; 11:1-16.

Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel taxol. **N Engl J Med** 1995; 332:1004-14.

Schena M, Shalon D, Davis R.W, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

Schlecht NF, Pintos J, Kowalski LP, Franco EL. Effect of type of alcoholic beverage on the risks of upper aerodigestive tract cancers in Brazil. **Cancer Causes Control** 2001; 12:579-87.

Shah JP, Shaha AR, Spiro RH, Strong EW. Carcinoma of the hypopharynx. **Am J Surg** 1976; 132:439-43.

Shiga H, Heath EI, Rasmussen AA, et al. Prognostic value of p53 glutathione S-transferase π and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. **Clin Cancer Res** 1999; 5:4097-104.

Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. **Nat Med** 2002; 8:68-74.

Sorlier T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguished tumor subclasses with clinical implication. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol** 1975; 98:503-17.

Southern EM, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. **Nat Genet** 1999; 21:5-9.

Stolf BS, Carvalho AF, Martins WK, et al. Differential expression of IGFBP-5 and two human ESTs in thyroid glands with goiter adenoma and papillary of follicular carcinomas. **Cancer Lett** 2003; 191:193-202.

Stolf BS, et al. Expression profile of malignant and non-malignant diseases of the thyroid gland reveals altered expression of a common set of genes in goiter and papillary carcinomas. **Cancer Lett** 2005; "in press".

Taniguchi K, Wada M, Kohno K, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. **Cancer Res** 1996; 56:4124-9.

Tillonen J, Homman N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. **Clin Exp Res** 1999; 23:1409-15.

Triche TJ, Schofield D, Buckley J. DNA microarrays in pediatric cancer. **Cancer J** 2002; 7:2-15.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med** 2002; 347:1999-2009.



van Houten V, Snijders P, van den Brekel M, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. **Int J Cancer** 2001; 93:232-5.

Vandenbrouck C, Eschwege F, de la Rochefordiere A, et al. Squamous cell carcinoma of the pyriform sinus: retrospective study of 351 cases treated at the Institut Gustave-Roussy. **Head Neck Surg** 1987; 10:4-13

Vartanian JG, Carvalho AL, Yueh B, et al. Long-term quality-of-life evaluation after head and neck cancer treatment in a developing country. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:1209-13.

Vassallo A, Correa P, De Stefani E, et al. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. **J Natl Cancer Inst** 1985; 75:1005-9.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. **Science** 1995; 270:484-7.

Vermund H. Role of radiotherapy in cancer of the larynx as related to the TNM system of staging. **Cancer** 1970; 25:485-504.

Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C, Gullane PJ, Pintilie M. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope** 1999; 109:249-58.

Wang CC, Suit HD, Blitzer PH. Twice-a-day radiation therapy for supraglottic carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1986; 12:3-7.

Wang E, Miller LD, Ohnmatcht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. **Nat Biotechnol** 2000; 18:457-9.

Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrality primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acid Res** 1992; 20:4965-70.

West M, Blanchett C, Dressman H, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:11462-67.

Weymuller EA, Yueh B, Deleyiannis FW, Kuntz AL, Alsarraf R, Coltrera MD. Quality of life in patients with head and neck cancer: lessons learned from 549 prospectively evaluated patients. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2000; 126:329-35.

Yang YH, Speed T. Design issues for cDNA microarray experiments. **Nat Rev Genet** 2002; 3:579-88.

Zhang W, Laborde PM, Coombes KR, Berry DA, Hamilton SR. Cancer genomics: promises and complexities. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2159-67.

zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:690-8.