

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES  
ASSOCIADOS À RECIDIVA LOCO-REGIONAL EM  
TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO**

**CAMILA MORAIS MELO**

**Dissertação apresentada à Fundação Antonio  
Prudente para obtenção do título de mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis**

**São Paulo**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Melo, Camila Morais

**Validação de marcadores moleculares associados à recidiva loco-regional em tumores de cabeça e pescoço** / Camila Morais Melo  
– São Paulo, 2010.

67p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO.  
2. MARCADORES DE CARCINOGENESE. 3. RECIDIVA LOCAL DE  
NEOPLASIA. 4. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 5. IMUNOHISTOQUÍMICA

*“Es inmoral pretender que una cosa deseada se realice mágicamente, simplemente porque la deseamos. Sólo es moral el deseo al que acompaña la severa voluntad de aprontar los medios de su ejecución.”*

*La rebelión de las masas (1930)*

*José Ortega y Gasset, filósofo español (1883-1955)*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luiz Fernando Lima Reis, por ter aberto as portas do seu laboratório tão gentilmente para a realização desse trabalho. Por ter depositado tanta confiança em mim, mesmo sem me conhecer. Por todos os ensinamentos científicos e conselhos em todas as nossas conversas. Pela paciência constante em solucionar todos os meus “problemas”. Por ser uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço e um exemplo de pesquisador para todos nós.

A CAPES e CEPID/FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos os pacientes que autorizaram que suas amostras fossem utilizadas, sem os quais esse trabalho jamais teria sido realizado.

À Pós-graduação da Fundação Antônio Prudente, por todo auxílio prestado.

Aos funcionários da Biblioteca, por sempre estarem disponíveis para todas as minhas dúvidas. Em especial à Suely Francisco, por todos os artigos “impossíveis” de encontrar e por toda a ajuda na formatação dessa dissertação.

À direção do Hospital AC Camargo, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À Suely Nonogaki, pela realização das reações de Imunoistoquímica.

À Aline Pacífico, que mesmo não tendo convivido comigo por muito tempo, sempre esteve carinhosamente disponível para solucionar todos os meus “problemas”, pelas conversas e conselhos.

Aos funcionários do Banco de RNA, pela ajuda e extração das amostras.

A todos os membros do laboratório, por me receberem tão amigavelmente, pelos ensinamentos, pela ajuda constante nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração. E por tornarem minha vida no laboratório mais divertida!

À Nair Muto, pela companhia, amizade, ensinamentos científicos, conversas de incentivo. Por ter me ajudado e me ensinado muito sobre todos os experimentos, interrompendo pacientemente o que estava fazendo para me ajudar.

À Letícia Lerner, pela amizade, ensinamentos e conversas descontraídas. Por me apresentar à “Liberty” e por todos os almoços divertidos. À Barbara Mello, pela amizade, pelos ensinamentos e pelos almoços animados.

À Ana Helena por todas as histórias engraçadas, pela amizade, pelos almoços divertidos. Por ter confiado em mim ao me ensinar vários experimentos com suas preciosas amostras, quando eu havia acabado de chegar sem saber nada de biologia molecular. Por tornar minha adaptação no laboratório mais divertida.

À Bianca Barreto pela amizade, pelas amostras e tabelas auto-explicativas com todos os dados. À Marina Baeta, pelas conversas, amizade e momentos descontraídos. À Aline Siqueira e Fernanda Monma pela amizade e descontração. À Anna Coló, minha companheira de *PCR* quantitativa.

À Juliana Monte Real, pelos ensinamentos de *PCR* quantitativa, pela amizade, pelas conversas até quase ficar noite. Pelas horas de explicação até que eu entendesse o quê estava fazendo. Ao Vladimir Lima pelos ensinamentos científicos, médicos e conselhos.

À Graziela Spilborghs, pela ajuda nos experimentos e por todos os momentos engraçados do laboratório.

À Sarah, Anderson e Chamberleim, pela ajuda com reagentes e materiais.

Ao Alex Carvalho e Adriana Abalen, por todos os ensinamentos científicos e ajuda no decorrer desse trabalho.

À Marcilei Buim, pelos TMAs, pela ajuda no ACIS e no equipamento de *PCR* quantitativa. Pelos ensinamentos e amizade.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, pela ajuda no ACIS e pelos ensinamentos de patologia.

Aos meus amigos de faculdade, Rodrigo, Aline, Tais, Thais e Joyce, por nossa amizade não ter acabado com a distância. Pelos emails animados, conversas no MSN e pelos convites de reencontros.

À minha família, por sempre acreditar em mim, por nunca deixar que eu desistisse dos meus sonhos.

Ao meu pai, Toninho, que nos momentos que eu ligava chorando, dizendo que queria desistir, usava a frase encorajadora “Não se preocupe, minha filha, você sempre pode voltar e será ótimo ter sua ajuda no supermercado”. Pelo seu exemplo de honestidade, companheirismo, amor, dedicação, amizade, respeito. Por sempre acreditar que eu posso ser uma pessoa melhor.

À minha mãe, Célia, pelo apoio infinito, pelas conversas de incentivo, pela fé inabalável, pelas orações que tanto me ajudam, pela confiança. Pelo seu exemplo de honestidade, abnegação, amor, amizade, dedicação, respeito. Por sempre acreditar em mim.

À minha irmã preferida, Paula, pela amizade, companheirismo e carinho. Pelas conversas, emails e torpedos de apoio. Pela fé também inabalável, pelas orações. Por acreditar que eu posso ser uma ótima cientista.

A todas as minhas tias e à minha Vó Maria, pelas orações, por não reclamarem da minha ausência. Por acreditarem em mim.

Ao Henrique, amor da minha vida, pelo apoio, companhia, amor e dedicação. Por ter estado presente em todos os momentos difíceis e por todos os momentos felizes, desde todos os anos de vestibular, faculdade e mestrado. Por tornar a minha adaptação em São Paulo muito mais fácil, agradável e divertida.

Aos meus amigos caninos, Elvis e Bob, pela amizade incondicional. Por ficarem alegres em me ver, pelos rabinhos abanando quando eu chegava e por terem tornado minha vida mais alegre.

Aos amigos espirituais, que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio, sustentação e me ajudando em todos os momentos em que precisei.

## RESUMO

Melo CM. **Validação de marcadores moleculares associados à recidiva loco-regional em tumores de cabeça e pescoço.** São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) está relacionado com uso de tabaco e álcool, a uma dieta pobre em vitaminas A e C, à exposição a agentes carcinogênicos ocupacionais e ambientais e à infecção por HPV. Após tratamento, a recorrência da doença é observada em 50% dos pacientes e nestes casos, a sobrevida livre de doença é de 4 anos. As metástases distantes são quase sempre ocultas no momento do diagnóstico da lesão primária. As alterações moleculares observadas em CECP são principalmente devidas à ativação de oncogenes, em especial a via de *EGF*, e inativação de genes supressores de tumor, como *p16* e *p53*. Em estudos realizados pelo nosso grupo comparamos o perfil de expressão gênica de tumores primários de pacientes tratados cirurgicamente, com margens livres de doença, esvaziamento cervical, e radioterapia adjuvante que recidivaram, em um período de 2 a 4 anos, e tumores com as mesmas características, mas que não recidivaram num período de 2,5 a 9 anos. Observamos a ativação em módulos funcionais relacionados à sinalização célula-célula, nos pacientes com recidiva positiva e inativação nas amostras dos pacientes com recidiva negativa. Pela técnica de *cDNA* Microarray, 7 genes (*EGLN3*, *IL1F9*, *INHBA*, *AREG*, *BST2*, *KLK6*, *CCL20*) estavam com expressão significativamente alterada nos módulos identificados. Assim, o objetivo desse trabalho foi validar pelas técnicas de *PCR* quantitativa em tempo real e Imunoistoquímica as alterações de expressão desses genes. Os genes *BST2* e *EGLN3* apresentaram-se diferencialmente expressos nas amostras de Carcinoma Epidermóide (CE) de cavidade oral, orofaringe e hipofaringe, não apresentando esse comportamento nas amostras de CE de laringe (p 0,0287 e p 0,0138, respectivamente, teste Mann-Whitney). Somente o gene

*BST2* também se mostrou diferencialmente expresso na comparação dos grupos recidiva e não recidiva nas amostras de CE de laringe (p 0,0352, teste Mann-Whitney). No ensaio de imunistoquímica, a proteína *EGLN3* também se mostrou diferencialmente expressa nos casos de CE de cavidade oral com recidiva positiva em comparação com os casos que não apresentaram recidiva (p 0,0022, teste Mann-Whitney). Esses resultados sugerem que o aumento de expressão do gene *EGLN3* pode ser um fator prognóstico de recorrência da doença em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, exceto na região topográfica de laringe.



## SUMMARY

Melo CM. **[Molecular markers validation associated with locoregional recurrence in head and neck tumors]** São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is associated to tobacco and alcohol consumption, deficiencies in vitamins A and C, exposure to occupational and environmental carcinogens and HPV infection. After treatment, recurrence is observed in 50% of patients and in these cases, the disease-free survival is 4 years. Distant metastases are almost always hidden at the time of diagnosis of primary lesion. The molecular changes observed in HNSCC are mainly due to the activation of oncogenes, in particular the pathway of *EGF*, and inactivation of tumor suppressor genes such as p16 and p53. In studies made by our group, we compared the gene expression profiling of primary tumors of patients treated surgically, neck dissection, with margins free of disease and adjuvant radiotherapy with tumor recurrence, within 2 to 4 years, and patients with the same characteristics, but showed disease-free for 2,5 to 9 years. We observed activation in functional modules related to cell-cell signaling, in patients with recurrence and inactivation in the samples from patients with no recurrence. By the *cDNA microarray* technique, 7 genes (*EGLN3*, *IL1F9*, *INHBA*, *AREG*, *BST2*, *KLK6*, *CCL20*) had significantly altered expression in the modules identified. The objective of this study was validated by Real time - *PCR* and immunohistochemical changes of expression of these genes. The genes *BST2* and *EGLN3* were differentially expressed in samples of oral cavity, oropharynx and hypopharynx squamous cell carcinoma, and did not show this behavior in samples of larynx squamous cell carcinoma (p 0.0287 and p 0.0138, respectively, Mann-Whitney test). And only *BST2* was differentially expressed between the groups recurrence and no recurrence in the samples of larynx squamous cell carcinoma (p 0.0352, Mann-Whitney test). In the

immunohistochemistry assays, the *EGLN3* protein was overexpressed in cases of oral cavity squamous cell carcinoma with recurrence when compared to cases without recurrence (p 0.0022, Mann-Whitney). These results suggest that overexpression of the gene *EGLN3* may be a prognostic factor of disease recurrence in head and neck squamous cell carcinoma, except in the topography of the larynx.

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1</b>	Modelo de instabilidade genética e progressão do CECP a partir do epitélio escamoso normal.....	6
<b>Figura 2</b>	Esquema da região anatômica acometida pelo CECP.....	8
<b>Figura 3</b>	Curvas para análise de resultados de amplificação das reações de <i>PCR</i> quantitativa.....	32
<b>Figura 4</b>	Produto de <i>PCR</i> quantitativa para os genes <i>KLK6</i> , <i>AREG</i> , <i>IL1F9</i> fracionado em gel de acrilamida 8%.....	33
<b>Figura 5</b>	Curva padrão de reações de <i>PCR</i> quantitativa.....	34
<b>Figura 6</b>	Eletroforese em gel de agarose 1% de <i>RNA</i> total de amostras de linhagens celulares do <i>RNA</i> referência.....	36
<b>Figura 7</b>	Eletroforese em gel de agarose 1% de <i>cDNA</i> das amostras analisadas onde foram fracionados os produtos da reação de <i>PCR</i> para o gene <i>p53</i> .....	41
<b>Figura 8</b>	Curvas para análise de resultados de amplificação das reações de <i>PCR</i> quantitativa para o gene <i>EGLN3</i> .....	42
<b>Figura 9</b>	Expressão relativa dos genes analisados por <i>PCR</i> quantitativa, no conjunto de todas as topografias estudadas.....	44
<b>Figura 10</b>	Expressão relativa dos genes analisados por <i>PCR</i> quantitativa, no conjunto de todas as topografias estudadas, exceto laringe..	45

<b>Figura 11</b>	Expressão relativa dos genes analisados por <i>PCR</i> quantitativa, nas amostras de carcinoma epidermóide de laringe.....	46
<b>Figura 12</b>	Fotomicrografias de cortes histológicos de carcinoma epidermóide de cavidade oral.....	48
<b>Figura 13</b>	Perfil da marcação de <i>EGLN3</i> nas amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral.....	49
<b>Figura 14</b>	Via de sinalização compreendendo os genes analisados nesse trabalho.....	56

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Módulos funcionais em amostras de CECP de pacientes que apresentaram recidivas após tratamento com cirurgia, esvaziamento cervical e radioterapia adjuvante (verde representa módulos inativos e vermelho, ativos).....	23
<b>Tabela 2</b>	Resultados encontrados na tese da Dra. Anna Estela Luiza Coló (2009), por <i>cDNA microarray</i> .....	24
<b>Tabela 3</b>	Amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço utilizadas no estudo.....	27
<b>Tabela 4</b>	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de <i>PCR</i> quantitativa dos genes normalizadores e genes selecionados na análise de vias e de módulos alterados em CECP.....	30
<b>Quadro 1</b>	Funções dos genes encontrados na tese da Dra. Anna Estela Luiza Coló (2009).....	24
<b>Quadro 2</b>	Linhagens celulares selecionadas para compor o <i>RNA</i> referência.....	35
<b>Quadro 3</b>	Painel do anticorpo utilizado.....	38
<b>Quadro 4</b>	Sistema de amplificação e cromógenos de detecção.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AKT</b>	ATP-dependent tyrosine kinase
<b>AREG</b>	“Amphiregulin”
<b>ATCC</b>	“American Type Cell Collection”
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>BST2</b>	“Bone marrow stromal cell antigen 2”
<b>CCL20</b>	“Chemokine (C-C motif) ligand 20”
<b>CDK</b>	“Cyclin dependent kinase”
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CE</b>	Carcinoma Epidermóide
<b>CECP</b>	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
<b>CG</b>	Citosina Guanina
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>Ct</b>	“cycle threshold”
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DMSO</b>	Dimetilssufóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	desoxinucleotídeo trifosfato
<b>E6</b>	“Transforming protein HPV”
<b>E7</b>	“Transforming protein HPV”
<b>EGF</b>	“epidermal growth factor”
<b>EGFR</b>	“epidermal growth factor receptor”
<b>EGLN3</b>	“Egl nine homolog”
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FW</b>	“foward”
<b>HE</b>	Hematoxilina - Eosina
<b>HEK 293</b>	Linhagem celular de rim embrionário humano
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	“Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit”
<b>HNSCC</b>	“Head and Neck Squamous Cell Carcinoma”
<b>HPV</b>	“human papillomavirus”

<b>IARC</b>	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
<b>IL1F9</b>	“Interleukin 1 family membre 9”
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>INHBA</b>	“Inhibin, beta A”
<b>KEGG</b>	“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
<b>KLK6</b>	“Kallikrein-related peptidase 6”
<b>M</b>	Molar
<b>M</b>	Presença de metástase à distância
<b>MAPK</b>	“Mitogen activated protein kinase”
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	“Matrix Metalloprotease”
<b>mTOR</b>	“Mechanistic target of Rapamycin”
<b>N</b>	<i>status</i> linfonodal
<b>NF-Kb</b>	“Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells”
<b>OMC</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	“Phosphate Buffered Saline”
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogênio Iônico
<b>PHD3</b>	Prolyl Hydroxylases domain 3
<b>PI3K</b>	“Phosphoinositide-3-kinase”
<b>PTEN</b>	“Phosphatase and tensin homolog”
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RNAsin</b>	Inibidor de Ribonuclease
<b>RV</b>	“reverse”
<b>S</b>	“slope”
<b>T</b>	tamanho do tumor
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	“Transforming growth factor $\alpha$ ”
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	“Transforming growth factor $\beta$ ”

<b>Tm</b>	Temperatura de melting
<b>TMA</b>	“Tissue Microarray”
<b>TNM</b>	Tamanho do tumor, <i>Status</i> linfonodal, Metástase à distância
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	“Vascular endothelial growth factor”
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Carcinomas.....	1
1.2	Carcinomas Epidermóides.....	5
1.3	Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço.....	5
1.4	Estruturas envolvidas no Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.....	7
1.5	Fatores de risco.....	8
1.5.1	Infecção pelo HPV.....	9
1.6	Sintomas.....	9
1.7	Tratamento e recorrência.....	10
1.8	Marcadores Moleculares em CECp.....	13
1.9	Classificadores Moleculares identificados em estudo prévio.....	22
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1	População de estudo.....	27
4.2	Metodologia empregada.....	28
4.2.1	Preparo do RNA.....	28
4.2.2	PCR quantitativa em tempo real.....	29
4.2.3	Ensaio de Imunoistoquímica.....	36
4.3	Análise estatística.....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1	Síntese do cDNA.....	40

5.2	<i>PCR</i> quantitativa em tempo real.....	41
5.2.1	Dados das reações.....	41
5.2.2	Análise das reações.....	43
5.3	Imunoistoquímica.....	47
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
6.1	Síntese do <i>cDNA</i> .....	50
6.2	<i>PCR</i> quantitativa em tempo real.....	54
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Carta aprovação do Comitê de Ética.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 CARCINOMAS**

O câncer representa um fardo muito grande para a sociedade. Além dos efeitos devastadores sobre os pacientes e suas famílias, os custos econômicos desse tipo de doença são enormes, tanto em termos de recursos médicos, cuidados com o tratamento e perdas humanas devido à mortalidade precoce (ETZIONI et al. 2003).

Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (Ministério da Saúde 2009). Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC/OMS) o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12,4 milhões de casos novos de câncer e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo (BOYLE e LEVIN 2008). Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca

de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (BOYLE e LEVIN 2008).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no gênero masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no gênero feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (Ministério da Saúde 2009). Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o gênero masculino e 253.030 para o feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (Ministério da Saúde 2009).

O câncer é a segunda maior causa de morte nos Estados Unidos da América, sendo responsável por 23,1% de todas as mortes ocorridas no ano de 2006. Um total de 1.479.350 novos casos e 562.340 mortes por câncer foram projetados para ocorrer nos Estados Unidos da América em 2009. Apenas doenças cardíacas matam mais indivíduos do que câncer, as quais são responsáveis por 26% de todas as mortes ocorridas em mesmo ano e país (JEMAL et al. 2009).

Nos últimos anos, nos EUA, as taxas de incidência por câncer diminuíram, tanto para o sexo masculino (1,8% por ano de 2001 a 2005) como para o sexo feminino (0,6% por ano de 1998 a 2005), principalmente por causa do decréscimo na incidência dos 3 principais sítios acometidos em homens (pulmão, próstata e colorretal) e nos 2 principais em mulheres (mama e colorretal). As taxas de morte causada por câncer também diminuíram, tanto em homens (19,2% entre 1990 e 2005) como em mulheres (11,4% entre 1991 e 2005). Mas, apesar do progresso ocorrido, o câncer ainda foi o maior agente causador de morte entre mulheres de 1 a 39 anos de idade e acima de 80 anos, no ano de 2006, nos EUA. O mesmo ocorreu com homens de 40 a 59 anos e acima de 80 anos (JEMAL et al. 2009).

Acredita-se que as células cancerosas são um resultado de uma manifestação de seis características típicas de células tumorais, comuns a mais de cem tipos de câncer. Essas características correspondem a sucessivas adaptações ambientais sofridas por uma célula normal, até sua transformação em uma célula tumoral, com capacidade de migração e alojamento em outros tecidos. Essas características são auto-suficiência de estímulos de crescimento, insensibilidade a estímulos inibitórios de crescimento, potencial de replicação indefinido, evasão da apoptose, angiogênese e invasão de tecidos e metástase (HANAHAN e WEINBERG 2000).

A primeira caracteriza-se pela habilidade de produzir, com independência, moléculas que estimulam o crescimento celular. Ou seja, 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. A segunda caracteriza-se pela evasão da ação de moléculas que inibem a proliferação celular. As células humanas apresentam limites intrínsecos em sua multiplicação, mas, a via que controla o potencial de replicação nas células cancerígenas parece agir de modo independente das outras vias metabólicas. A terceira característica é o potencial de se replicar indefinidamente, bloqueando os mecanismos que normalmente limitariam a divisão celular. A quarta habilidade é a de evasão da morte celular programada, mecanismo disparado pelas células sempre que algo anormal é detectado, como divisão acelerada. Adquirir resistência à apoptose é uma habilidade que provavelmente todos os tipos de câncer compartilham, e existem diversas estratégias para fazê-lo. A quinta habilidade caracteriza-se pela indução de formação de novos vasos sanguíneos, responsáveis por trazer sangue com nutrientes e oxigênio indispensáveis para o tumor em crescimento. A neovascularização é um pré-requisito para a rápida expansão clonal (monoclonal) necessária para a formação do tumor macroscópico. Desta forma, a indução da angiogênese é um evento que provavelmente ocorre entre o início e a metade do surgimento do câncer. A sexta e última característica é a habilidade de invadir outros tecidos. 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 novas habilidades 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).

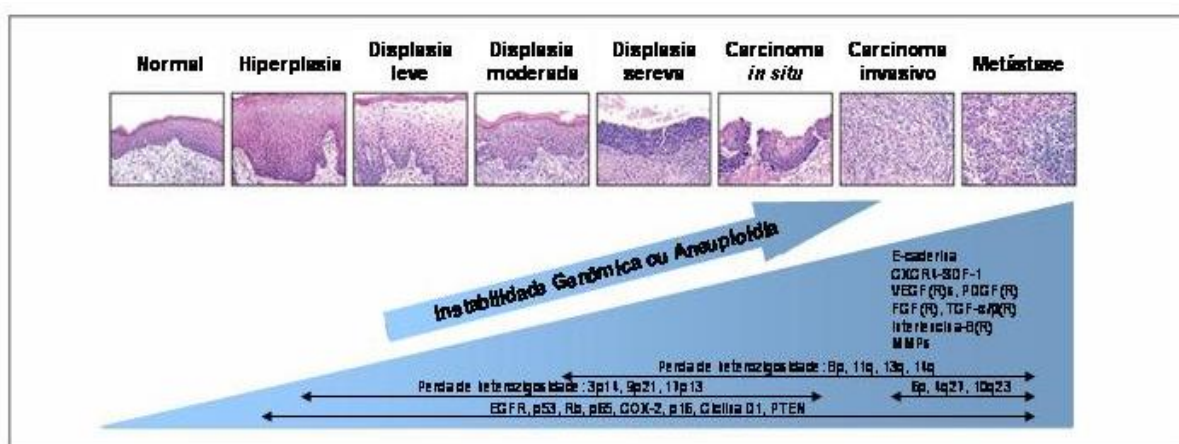
## **1.2 CARCINOMAS EPIDERMÓIDES**

Carcinomas epidermóides são neoplasias malignas originadas de células epiteliais, derivadas de qualquer um dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) (KUMAR et al. 2005). Nos carcinomas epidermóides encontram-se células escamosas reconhecíveis, oriundas da camada basal de qualquer epitélio estratificado escamoso do corpo (COTRAN et al. 1999).

## **1.3 CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO**

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto tipo de tumor mais comum no mundo e representa 90% dos tumores dessa região (HARDISSON 2003; GINOS et al. 2004). Segundo estimativa INCA 2010, nos homens, os Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço representam o quinto tumor mais frequente e com cerca de 10.330 novos casos em 2010. Já nas mulheres, este tipo de tumor representa o sétimo mais freqüente e com estimativa para 2010 de 3.790 novos casos (Ministério da Saúde 2009).

Os CECP são uma doença complexa, caracterizada pela heterogeneidade clínica, patológica, fenotípica e biológica. A evolução e a progressão desse câncer são resultantes de múltiplas alterações de mecanismos celulares e moleculares no epitélio estratificado escamoso da mucosa das vias aerodigestivas superiores. A progressão do CECP envolve várias etapas de diferenciação histológica, de um epitélio normal à hiperplasia, displasia leve, displasia moderada, displasia severa, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e metástase, sugerindo um modelo de progressão molecular a partir de lesões pré-malignas até a doença invasiva (Figura 1) (ALMADORI et al. 2008; HADDAD e SHIN 2008; THOMAS e GRANDIS 2009).



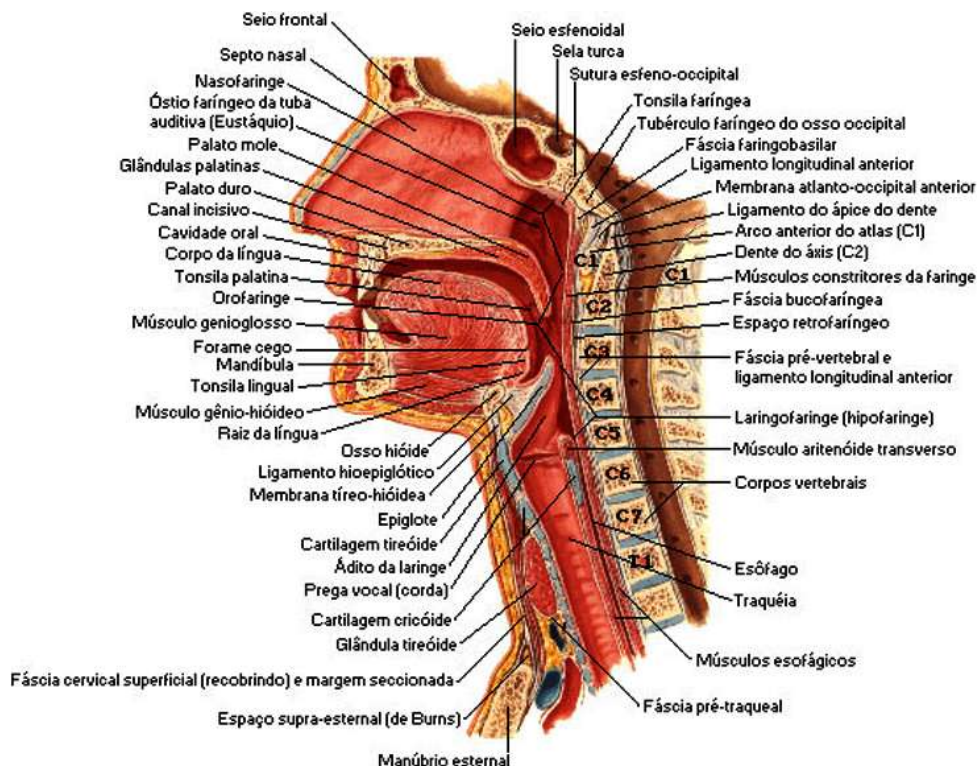
Fonte: Modificado de HADDAD e SHIN (2008)

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



## **1.4 ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO**

Os Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço podem surgir em qualquer parte da cavidade oral, cavidade nasal, seios paranasais, faringe e laringe. A cavidade oral inclui os lábios, mucosa ou região jugal, assoalho bucal, língua oral (dois terços anteriores), gengiva inferior e superior, palato duro e área retromolar. A faringe possui três subdivisões: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe. A nasofaringe é contínua à cavidade nasal e está conectada ao ouvido médio pelas Trompas de Eustáquio. A orofaringe compreende a base da língua (terço posterior), valécula, loja amigdaliana, pilares e sulcos glosso-amigdalianos, palato mole, úvula e parede faríngea posterior entre a hipofaringe e a nasofaringe. A hipofaringe, delimitada pelo osso hióide e a cartilagem cricóide, é dividida em área pós-cricóide, seios piriformes e parede posterior. A laringe é subdividida em supraglótica, glótica e subglótica. A região supraglótica compreende a epiglote, as falsas cordas vocais, os ventrículos, as pregas ariepiglóticas e as aritemóides. A região glótica inclui as pregas vocais, as comissuras posterior e anterior. A região subglótica tem 2 cm de extensão e se estende desde as cordas vocais até a traquéia (SIDRANSKY 2008; Ministério da Saúde 2009).



**Figura 2** - Esquema da região anatômica acometida pelo CECP.

## 1.5 FATORES DE RISCO

A gênese desse tumor está associada ao uso de tabaco e álcool, a uma dieta pobre em vitaminas A e C, à exposição a agentes carcinogênicos ocupacionais e ambientais (KOWALSKI et al. 2005; RICKMAN et al. 2008) e à infecção pelo HPV (human papiloma virus) (GILLISON et al. 2000; APPLEBAUM et al. 2007; HASHIBE et al. 2007; CHANG e CALIFANO 2008; RICKMAN et al. 2008; GOON et al. 2009). Os fumantes que não bebem apresentam um risco 2 a 4 vezes maior de desenvolver esses cânceres quando comparados com não fumantes, enquanto os que consomem álcool e fumam exibem um aumento de 6 a 15 vezes (COTRAN et al. 1999).

### **1.5.1 Infecção pelo HPV**

O vírus HPV está relacionado com o surgimento de alguns tumores. A infecção pelo HPV está etiologicamente ligada ao câncer de colo de útero (WALBOOMERS et al. 1999). Evidências moleculares também sugerem um envolvimento do HPV, especialmente o HPV-16, na patogênese de um subgrupo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e os oncogenes virais E6 e E7 estão frequentemente com expressão aumentada em orofaringe (GILLISON et al. 2000; ARGIRIS et al. 2008; CHANG e CALIFANO 2008; GOON et al. 2009). Não há evidência de sinergia entre a exposição ao HPV e o uso de tabaco e álcool na associação HPV e carcinoma de orofaringe. Alguns estudos sugerem duas vias distintas relacionadas ao desenvolvimento de carcinoma de orofaringe: a primeira provavelmente direcionada pelo uso de tabaco e álcool e a outra pela instabilidade genética induzida pela infecção pelo HPV (CHANG e CALIFANO 2008; HADDAD e SHIN 2008; GOON et al. 2009).

## **1.6 SINTOMAS**

Os sintomas incluem “feridas” que não se curam, rouquidão e dor na deglutição; mas também podem ocorrer obstrução nasal, epistaxis, rinorréia, dor, parestesia, plenitude ou inchaço do nariz ou da bochecha, uma ferida nasal persistente ou úlcera e massa nasal (PILCH et al. 2005; HADDAD e SHIN 2008). A sobrevida, livre de doença, é ainda pobre; cerca de 30 a 50% dos pacientes sobrevivem uma média de 5 anos, provavelmente devido à

recorrência da doença, presença de metástases ou surgimento de um segundo tumor (FORASTIERE et al. 2001; LE TOURNEAU et al. 2005; GASPAROTTO e MAESTRO 2007; PRINCE e AILLES 2008; RICKMAN et al. 2008).

Nos estágios iniciais, os tumores da cavidade oral aparecem como placas firmes, elevadas e nacaradas, ou como áreas irregulares, ásperas ou verrucosas de espessamento da mucosa, possivelmente confundidas com leucoplasia. Com o aumento dessas lesões, elas criam massas salientes ou sofrem necrose central, formando uma úlcera irregular e áspera, com bordas elevadas, firmes e onduladas. Os locais preferidos de metástases são os linfonodos mediastinais, os pulmões, o fígado e os ossos. Infelizmente, essas metástases distantes são quase sempre ocultas no momento da descoberta da lesão primária (COTRAN et al. 1999). Aproximadamente metade das metástases são diagnosticadas após 9 meses do diagnóstico do tumor primário e 90% são detectadas até 3 anos após o tumor primário (BRAAKHUIS et al. 2006; GASPAROTTO e MAESTRO 2007; SIDRANSKY 2008).

## **1.7 TRATAMENTO E RECORRÊNCIA**

O tratamento inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia e baseia-se na localização da lesão e no estadiamento TNM (onde T representa o tamanho do tumor, N, os linfonodos regionais comprometidos pela doença e M, as metástases à distância) (GROOME et al. 2001). O esvaziamento

cervical é indicado em todos os casos de linfonodos palpáveis ao exame clínico, orofaringe, valécula, loja amigdaliana, base da língua e palato mole, hipofaringe e em casos de lesões da cavidade oral com espessura igual ou superior a 3mm situadas no andar inferior (língua, assoalho, gengiva inferior, retromolar e região jugal). A quimioterapia e radioterapia concomitantes são empregadas em alguns casos, mas também podem ser como terapia adjuvante à cirurgia e como tratamento paliativo (GATH e BRAKENHOFF 1999; BELBIN et al. 2002; BRAAKHUIS et al. 2006; PRINCE e AILLES 2008; RICKMAN et al. 2008).

Depois do tratamento a recorrência da doença, localmente, regionalmente ou à distância, é observada em 50% dos pacientes, com altas taxas associadas à mortalidade (BELBIN et al. 2002; BRAAKHUIS et al. 2006; PRINCE e AILLES 2008; RICKMAN et al. 2008; PENTHEROUDAKIS et al. 2009). O risco de recorrência local, em estágios avançados da doença, é observado em 30 a 40% dos pacientes (GATH e BRAKENHOFF 1999).

A presença de linfonodos cervicais positivos está associada a um maior risco de recorrência regional, metástases à distância e pior sobrevida. A sobrevida para pacientes sem comprometimento linfonodal detectável nos exames anátomo-patológicos pode chegar a 85%, já para pacientes com metástases em linfonodos cervicais esta cai para menos de 54%. No entanto, acredita-se que de 20 a 50% dos casos sem linfonodos comprometidos ao exame clínico-patológico apresentem micrometástases e, por essa razão, mau prognóstico (GATH e BRAKENHOFF 1999;

BRAAKHUIS et al. 2006; GASPAROTTO e MAESTRO 2007; PENTHEROUDAKIS et al. 2009).

A predição do potencial metastático em CECP é, ainda hoje, confiada à evolução clínica e histológica do tumor. No entanto, a alta porcentagem de recorrências do tumor mostra a inadequação desses parâmetros na predição do potencial metastático (GATH e BRAKENHOFF 1999; CORTESINA e MARTONE 2006; ALMADORI et al. 2008; PENTHEROUDAKIS et al. 2009).

O tratamento convencional com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, assim como recidivas loco-regionais que podem ocorrer após o tratamento, estão associados com significativa morbidade, afetando a fala, a capacidade de engolir e a qualidade de vida dos pacientes, portanto, esforços substanciais em identificar marcadores moleculares que levam a uma exata previsão nos riscos de recorrência da doença em pacientes devem ser realizados (SMITH et al. 2001; PRINCE e AILLES 2008).

A maioria dos pacientes com CECP localmente avançado, estadio III ou IV, requerem uma combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Pacientes em estágios iniciais, estadio I ou II, são frequentemente tratados com radioterapia e cirurgia e têm prognóstico excelente. No entanto, aqueles pacientes com alto risco de recorrência e segundos tumores primários necessitam de uma maior monitoração após o tratamento (ALMADORI et al. 2008). O maior desafio do tratamento de qualquer tipo de tumor é a obtenção da cura com preservação de estruturas e funções vitais. Isso é especialmente verdade para os cânceres de regiões anatômicas complexas como cabeça e pescoço, onde a maioria das estruturas e funções é afetada

pelo câncer e pelo tratamento (ROEPMAN et al. 2006; ALMADORI et al. 2008; HADDAD e SHIN 2008; PRINCE e AILLES 2008).

A localização anatômica e o estadiamento TNM são guias na seleção do tratamento, porém, pacientes com características tumorais semelhantes podem apresentar diferentes respostas ao mesmo tipo de tratamento (GATH e BRAKENHOFF 1999; ROEPMAN et al. 2006; PRINCE e AILLES 2008; RICKMAN et al. 2008).

## **1.8 MARCADORES MOLECULARES EM CECP**

As alterações moleculares observadas em Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço são principalmente devidas a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, levando à desregulação da proliferação celular (GINOS et al. 2004; HARDISSON 2003; HADDAD e SHIN 2008). Esses eventos, acumulados progressivamente com o tempo, formam um ambiente carcinogênico, tornando-se a causa do desbalanço molecular genético associado aos tumores de cabeça e pescoço, os quais são favorecidos por algumas condições ligadas ao paciente, como uso de tabaco, álcool e infecção por HPV (KOWALSKI et al. 2005; CORTESINA e MARTONE 2006; APPLEBAUM et al. 2007; HASHIBE et al. 2007; HADDAD e SHIN 2008; RICKMAN et al. 2008). O processo de invasão tumoral está associado com numerosas alterações moleculares que podem ser usadas como potenciais marcadores moleculares de prognóstico. No entanto,

nenhuma dessas alterações é usada na prática clínica (CORTESSINA e MARTONE 2006; HADDAD e SHIN 2008).

O prognóstico em casos avançados de Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço é particularmente pobre devido a variações no comportamento biológico dos tumores (HARDISSON 2003; PALKA et al. 2008). E é frequentemente, relacionado com recidiva local e regional e à presença de metástase linfonodal (ROEPMAN et al. 2006; CORTESSINA e MARTONE 2006; HADDAD e SHIN 2008; PALKA et al. 2008). Tumores em mesmo estágio podem responder diferentemente ao mesmo tratamento. Portanto, é essencial identificar marcadores que possam distinguir diferenças no comportamento dos tumores (HARDISSON 2003; GINOS et al. 2004; ROEPMAN et al. 2006; RICKMAN et al. 2008). Dessa forma, novas estratégias para ajudar o controle da doença são necessárias.

Os marcadores moleculares são usados para detecção inicial de lesões malignas ou com alto risco de malignização, uso de informações no prognóstico e, no futuro, eles poderão servir para selecionar novas terapias para diversos tipos de tumores. Esses marcadores podem ser usados, por exemplo, para indicar tratamentos cirúrgicos em pacientes com alto risco de recidiva loco-regional, permitindo, assim, melhores resultados no tratamento com radioterapia pós-operatória (GINOS et al. 2004; RICKMAN et al. 2008; PALKA et al. 2008).

Algumas evidências ligadas à evolução histológica do tumor primário e os linfonodos loco-regionais, como ruptura capsular do linfonodo e embolização intravascular tumoral podem ser consideradas absolutamente



preditivos do processo de metastatização, o qual é um resultado da aquisição de um fenótipo mais invasivo de alguns clones de células, aonde ganham uma forte capacidade migratória, juntamente com a capacidade de algumas células de penetrar os vasos sanguíneos e os linfáticos levando a metástases loco-regionais e à distância. Esse processo de metastatização envolve: alterações genéticas capazes de induzir o fenótipo metastático invasivo durante a progressão tumoral (ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor), desagregação na adesão célula-célula e célula-matriz (destacamento de células tumorais do tumor primário e invasão da membrana), migração de células tumorais, modulação da matriz extracelular e proteólise e angiogênese. Esses eventos tardios são relacionados, sob o ponto de vista molecular, a alterações de expressão de moléculas adesivas, à secreção de enzimas proteolíticas, metaloproteínas e citocinas tendo ação angiogênica e imunossupressora (CORTESINA e MARTONE 2006; PALKA et al. 2008).

Múltiplos eventos epigenéticos e genéticos, incluindo expressão ou função aberrante de reguladores do ciclo celular, crescimento e sinalização, motilidade, apoptose, angiogênese e micro *RNAs* estão implicados na patogênese de CECP e constituem possíveis alvos de terapia (MATTA e RALHAN 2009).

A mudança mais comum, que ocorre em eventos tardios durante o desenvolvimento do CECP, é a perda da região cromossômica 9p21, que contém o gene p16, um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) (REED et al. 1996; PAPADIMITRAKOPOULOU et al. 1997; GASPAROTTO

e MAESTRO 2007; CHANG e CALIFANO 2008; HADDAD e SHIN 2008; PALKA et al. 2008). Outras alterações genômicas correlacionadas com CECP são a perda de heterozigiosidade em 17p13 e a amplificação de 11q13, codificando respectivamente p53 e ciclina D1. Alguns estudos reportam alterações genômicas em 3p14, 4q27, 6p, 8p, 10p23, 11q, 13q e 14q e amplificação, deleção, aumento ou diminuição de expressão de certos oncogenes ou genes supressores de tumor, incluindo EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), p53, Rb, p65, COX-2 (ciclooxigenase 2), p16, ciclina D1 e PTEN, como um preditor de progressão à malignidade, porém nenhuma dessas alterações têm sido definitivamente ligadas à presença de metástases (CHOW et al. 2001; VAN HOUTEN et al. 2002; CORTESINA e MARTONE 2006; GASPAROTTO e MAESTRO 2007; CHANG e CALIFANO 2008; HADDAD e SHIN 2008; MOLINOLO et al. 2008; PALKA et al. 2008; PRINCE e AILLES 2008). Muitos genes, incluindo aqueles que codificam E-caderina (CDH1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , interleucina 8, e seus respectivos receptores, juntamente com as metaloproteinases de matriz (MMP), estão envolvidos principalmente com progressão de metástase e progressão dos estágios tardios do tumor. (HADDAD e SHIN 2008; MOLINOLO et al. 2008; PRINCE e AILLES 2008).

A desregulação das vias de sinalização em CECP inclui EGFR, Ras, TGF- $\beta$ , NF $\kappa$ B, Stat, Wnt/ $\beta$ -catenina e PI3K/ AKT/ mTOR. A atividade aberrante dessas vias de sinalização inter-relacionadas contribui para o

desenvolvimento do CECP (CHUNG et al. 2004; MOLINOLO et al. 2008; PENTHEROUDAKIS et al. 2009).

A ativação da sinalização de EGFR é um dos principais mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia em pacientes com CECP, sendo considerado o principal alvo terapêutico nesse tipo de doença (ANG et al. 2004; CHUNG et al. 2004; RODEMANN et al. 2007; PALKA et al. 2008; PENTHEROUDAKIS et al. 2009). Sob a ligação com seus ligantes (EGF ou TGF- $\alpha$ ) EGFR forma um homodímero ou heterodímero com outros membros da família Erb (Her2/neu, Erb3, Erb4) e ativa negativamente a cascata de sinalização Ras/ Raf/ MAPK e as vias PI3K/ Akt/ mTOR. A ativação desses eventos de sinalização é responsável pela regulação de processos tumorigênicos, como, proliferação, inibição da apoptose, adesão e motilidade celular, crescimento e sobrevivência (O-CHAROENRAT et al. 2002; CHUNG et al. 2004; CHANG e CALIFANO 2008; HADDAD e SHIN 2008; MATTA e RALHAN 2009). O aumento de expressão de EGFR é observado em mais de 90% dos CECP, porém, somente um subgrupo desses tumores mostra um comportamento clínico respondedor ao tratamento com inibidores de EGFR (CHUNG et al. 2004; ROGERS et al. 2005; MORGILLO et al. 2007; CHANG e CALIFANO 2008; HADDAD e SHIN 2008; PENTHEROUDAKIS et al. 2009). As potenciais razões para a falha na resposta aos inibidores de EGFR incluem: a constitutiva ativação de Ras/ Raf/ MAPK, STAT3 e as vias PI3K/ AKT/ mTOR, independente de EGFR por outros estímulos, como hipóxia, ativação de Ras ou mutação e inibição de PTEN (CHUNG et al. 2004; MATTA e RALHAN 2009).

O aumento de expressão de VEGF e seus receptores acentua a importância da via VEGF na angiogênese e na sobrevivência das células tumorais sob condições de hipóxia (CHUNG et al. 2004; SHANG et al. 2006; LIANG et al. 2008). A expressão de VEGF é regulada pelo fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) envolvendo as vias PI3K e AKT (MATTA e RALHAN 2009). Os CECP mostram uma heterogeneidade angiogênica inter-tumoral. A compreensão profunda da variabilidade do fenótipo angiogênico dentro dos CECP é importante para designar quais citocinas serão alvos para as terapias anti-angiogênicas (MATTA e RALHAN 2009; PENTHEROUDAKIS et al. 2009; THOMAS e GRANDIS 2009).

A ativação incontrolada das vias PI3K/ AKT/ mTOR contribui para o desenvolvimento e progressão do CECP e é um importante alvo para neutralizar a resistência à radioterapia e à quimioterapia (CHUNG et al. 2004; BUSSINK et al. 2008). Deleção de PTEN e mutações no gene PI3K apresentam capacidade transformacional *in vitro* e *in vivo*, conseqüentemente, restauração da mutação ou ausência de atividade de PTEN pode ser um alvo para inibição de AKT. Inibidores de protease regulam negativamente a fosforilação e expressão de PI3K ativo, que é responsável pela radioresistência em CECP. Ativação de AKT é um possível mecanismo de resistência aos inibidores de EGFR, assim, a combinação de inibidores de AKT e agentes anti-angiogênicos podem ser úteis na conduta de tratamento dos pacientes com CECP (CHUNG et al. 2004; MATTA e RALHAN 2009; THOMAS e GRANDIS 2009).

A complexidade da sinalização em CECP explica porque a interferência de somente uma etapa dessas vias não mostra eficiência na resposta clínica dos pacientes dessa doença. As células do CECP têm a habilidade de explorar diversas vias de sinalização para obter vantagem de crescimento, sobrevivência celular e evadir ao mecanismo de apoptose (ROEPMAN et al. 2006; PALKA et al. 2008; MATTA e RALHAN 2009; THOMAS e GRANDIS 2009).

Após o início tumoral, um dos primeiros passos para o processo metastático é a perda da integridade epitelial o que reduz a adesão célula-célula e célula-matriz, envolvendo moléculas adesivas. Essas moléculas envolvidas no processo metastático compreendem quatro famílias de proteínas: caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas. Essas proteínas interagem com as moléculas da base da membrana e regulam o espaço célula-célula e célula-matriz extracelular e suas interações metabólicas. As moléculas de E-caderina são expressas em todo epitélio normal e medeiam a adesão célula-célula em meio dependente de cálcio. Em pacientes com CECP a perda de expressão dos componentes do complexo E-caderina é uma anormalidade comum, e a redução ou expressão aberrante dessa proteína está associada com a presença de metástases cervicais. As integrinas são glicoproteínas transmembranas expressas por diversos tipos celulares, principalmente de origem epitelial. São receptores para componentes da matriz extracelular mediando interação entre célula e substrato ou moléculas de adesão célula-célula. Desempenham papel na migração, extensão e metástase em tumores

malignos. A expressão aberrante está implicada à invasão tumoral e metástase em CECP (CORTESINA e MARTONE 2006).

A aquisição de mobilidade celular (migração) representa um papel central no complexo processo de metástase. Essa migração é um componente crítico na invasão das células dos tumores primários, possibilitando que as células ganhem acesso à vasculatura. Isto também possibilita que as células penetrem em tecidos diferentes em sítios distantes. O processo de progressão tumoral para o estado metastático é facilitado por mutações nas moléculas de sinalização, as quais traduzem sinais necessários para estimular a movimentação celular (CORTESINA e MARTONE 2006).

O estadiamento clínico (TNM) e grau de diferenciação patológico constituem os fatores mais importantes na predição do prognóstico em CECP, porém, nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado o papel prognóstico de várias moléculas envolvidas no processo de progressão do tumor e metastatização. Algumas dessas moléculas mostraram-se potencialmente úteis como marcadores de mau prognóstico, em função de sua capacidade de avaliar e prever a presença de metástases. No entanto, nenhum desses possíveis marcadores é atualmente empregado na prática clínica, provavelmente porque a análise de sua expressão, em geral através de imunistoquímica ou técnicas quantitativas, mostrou um envolvimento na progressão tumoral, sem, no entanto, ser capaz de atribuir-lhes um específico papel marcador para metástases em CECP. Isto é plausível, se pensarmos que o desenvolvimento de metástases

depende da migração das células tumorais, da destruição dos obstáculos, do desenvolvimento de novos vasos, da disponibilidade dos vasos linfáticos e da presença de características fenotípicas que permitem o crescimento, sobrevivência e resistência das células a apoptose e a evasão das defesas imunológicas. Todos esses processos envolvem a alteração de diversos percursos e é necessário considerar que os dados reportados levam a resultados contrastantes. Esta falta de uniformidade dos dados pode ser atribuída à grande variação nos métodos utilizados, tais como a utilização de diferentes anticorpos, que reconhecem epítopos diferentes das proteínas analisadas, a inevitável falta de uniformidade nos ensaios, realizados em diferentes laboratórios, a diferente interpretação dos resultados e o pequeno número de casos analisados (ROEPMAN et al. 2006; CORTESINA e MARTONE 2006).

No entanto, esses parâmetros prognósticos clínicos frequentemente subestimam a presença de envolvimento linfonodal e a frequência de recorrência indica que um número de células tumorais disseminadas é indetectável pelos métodos atuais. Assim há a necessidade de encontrar um método e um marcador para detectar e diagnosticar microscopicamente as metástases ocultas (CORTESINA e MARTONE 2006; ROEPMAN et al. 2006; GASPAROTTO e MAESTRO 2007).

Há poucos, ou nenhum, marcadores moleculares confiáveis capazes de promover uma detecção inicial ou de serem indicadores de prognóstico (BELBIN et al. 2002; ROEPMAN et al. 2006; RICKMAN et al. 2008). Alguns estudos envolvendo *cDNA Microarrays* têm identificado alguns genes cuja

expressão estava modificada em casos de Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço, principalmente comparada com tecidos normais (VILLARET et al. 2000; LEETHANAKUL et al. 2000; ROEPMAN et al. 2006; ALMADORI et al. 2008; RICKMAN et al. 2008).

Em nosso laboratório, por exemplo, já foram identificados, com essa técnica, classificadores para detecção de doença pré-maligna em estômago e tireóide, que permitiria um diagnóstico mais precoce e também marcadores para predição de resposta a quimioterapia e radioterapia em carcinoma epidermóide de laringe (MEIRELES et al. 2004; GOMES et al. 2005; STOLF et al. 2005). Esses estudos estão em fase de validação e se forem confirmados permitirá que pacientes sejam tratados de maneira mais específica, evitando a progressão da doença e possibilitando a preservação dos órgãos.

## **1.9 CLASSIFICADORES MOLECULARES IDENTIFICADOS EM ESTUDO PRÉVIO**

Recentemente, nosso grupo passou a empregar novas metodologias de análise de dados de *cDNA Microarray* que defendem que alterações significativas na expressão gênica podem manifestar-se no âmbito de vias ou conjuntos de genes co-regulados que apresentem funções semelhantes (EISEN et al. 1998; MOOTHA et al. 2003; SEGAL et al. 2003, 2004). Esse esforço para encontrar conjuntos de genes diferencialmente expressos que pertençam a uma mesma via metabólica promove um maior entendimento



de processos biológicos, embora não seja possível identificar quais são os mecanismos celulares regulatórios (SEGAL et al. 2003).

Através da técnica de *cDNA Microarray*, COLÓ (2009) analisou perfis de expressão gênica de casos de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Foi observada alteração em módulos funcionais relacionados à sinalização célula-célula, estando ativo nos pacientes com recidiva positiva e inativo nos pacientes com recidiva negativa (Tabelas 1 e 2). De acordo com essa metodologia foram obtidos, na tese citada acima, dados da expressão de sete genes relacionados aos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço que apresentaram recidiva loco-regional e aos pacientes que não apresentaram recidiva (Quadro 1).

**Tabela 1** - Módulos funcionais em amostras de CECP de pacientes que apresentaram recidivas após tratamento com cirurgia, esvaziamento cervical e radioterapia adjuvante (verde apresenta módulos inativos e vermelho, ativos).

Grupo	Módulo	Gene	p-valor
Recidiva Positiva (24 amostras)	Biossíntese de diterpenóides	<i>EGLN3</i>	$1,9 \times 10^{-3}$
	Sinalização célula-célula	<i>IL1F9</i>	$2,4 \times 10^{-21}$
		<i>INHBA</i>	$1,4 \times 10^{-15}$
		<i>AREG</i>	$4,3 \times 10^{-15}$
		<i>BST2</i>	$1,0 \times 10^{-10}$
		<i>KLK6</i>	$6,1 \times 10^{-4}$
		<i>CCL20</i>	$4,1 \times 10^{-3}$
Recidiva Negativa (31 amostras)	Sinalização célula-célula	<i>IL1F9</i>	$2,4 \times 10^{-21}$
		<i>INHBA</i>	$1,4 \times 10^{-15}$
		<i>AREG</i>	$4,3 \times 10^{-15}$
		<i>BST2</i>	$1,0 \times 10^{-10}$
		<i>KLK6</i>	$6,1 \times 10^{-4}$
		<i>CCL20</i>	$4,1 \times 10^{-3}$

**Tabela 2** - Resultados encontrados na tese COLÓ (2009), por *cDNA Microarray*

Comparação	Gene	Módulos funcionais, p-valor	Teste de Wilcoxon, p-valor	Fold
Recidiva Positiva (24)	<i>BST2</i>	$1,0 \times 10^{-10}$	0,32	-
	<i>EGLN3</i>	$1,9 \times 10^{-3}$	0,0026	1,67
	<i>IL1F9</i>	$2,4 \times 10^{-21}$	0,12	-
Recidiva Negativa (31)	X <i>AREG</i>	$4,3 \times 10^{-15}$	0,31	-
	<i>CCL20</i>	$4,1 \times 10^{-3}$	0,10	-
	<i>INHBA</i>	$1,4 \times 10^{-15}$	0,42	-
	<i>KLK6</i>	$6,0 \times 10^{-4}$	0,88	-

**Quadro 1** - Funções dos genes encontrados na tese COLÓ (2009).

Símbolo (sinônimos)	Nome do gene	Função*
<b><i>AREG</i></b> (AR, SDGF, CRDGF, MGC13647)	<i>Amphiregulin</i>	Interage com o receptor EGF/TGF- $\alpha$ para promover o crescimento das células epiteliais normais e inibe o crescimento de algumas linhagens celulares de carcinomas agressivos; Mitógeno para fibroblastos.
<b><i>BST2</i></b> (CD317)	<i>Bone marrow stromal cell antigen 2</i>	Essa proteína pode desempenhar um papel no crescimento de pré-células B e na artrite reumatóide.
<b><i>CCL20</i></b> (CKb4, LARC, ST38, MIP3A, MIP-3a, SCYA20)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	As citocinas são uma família de proteínas secretadas envolvidas em processos inflamatórios e imunoregulatórios. As citocinas C-C são caracterizadas por duas cisteínas adjacentes. CCL20 apresenta atividades mitogênicas, quimiotáticas e próinflamatórias.
<b><i>EGLN3</i></b> ( <i>PHD3</i> , HifPH3, FLJ21620, MGC125998, MGC125999)	<i>Egl nine homolog 3</i>	É um gene regulador da agregação proteica em resposta à variação da disponibilidade de oxigênio; Em condições de normóxia, marca HIF (hypoxia-inducible factor) para hidroxilação e posterior degradação; Em hipóxia crônica ocorre superexpressão da proteína codificada por esse gene, a qual induz a “desensibilização” de HIF $\alpha$ , protegendo as células de morte por necrose e adaptando-as à hipóxia (GINOUVÈS et al. 2008).
<b><i>IL1F9</i></b> (IL1E, IL1H1, IL-1F9, IL-1H1, IL1RP2, IL-1RP2, <i>IL1F9</i> )	<i>Interleukin 1 family, member 9</i>	Juntamente com interferon- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ estimula a expressão de citocinas nos queratinócitos; A proteína está envolvida em processos inflamatórios e ativa o mecanismo de NF- $\kappa$ B.
<b><i>INHBA</i></b> (EDF, FRP)	<i>Inhibin, beta A</i>	A sub-unidade $\beta$ A se liga à sub-unidade $\alpha$ para formar um inibidor de secreção de FSH. A inibina apresenta atividade de regulação de células do estroma gonadal, inibindo sua proliferação, além de apresentar atividade anti-tumoral.
<b><i>KLK6</i></b> (Hk6, Bssp, Kik7, SP59, ZYME, PR559, PR5518, MGC9355, NEUROSIN)	<i>Kallikrein-related peptidase 6</i>	Degrada <i><math>\alpha</math>-synuclein</i> e impede sua polimerização; Pode estar envolvido na patogênese da doença de Parkinson; encontra-se menos expresso em Alzheimer; Envolvido na regulação do crescimento axonal após lesão medular; Desempenha papel relacionado a invasão e metástase; Apresenta resposta a ferimentos e a degradação de colágeno.

a. função de acordo com o LocusLink (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e fontes de referências interligadas a esse banco de dados.

## 2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo estuda tumores de interesse em nossa comunidade, como o Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Através da técnica de *cDNA Microarray* (COLÓ 2009) analisamos perfis de expressão gênica de casos de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Com as 121 amostras estudadas, foi possível comparar o perfil de expressão gênica num grupo de 55 pacientes tratados cirurgicamente, com esvaziamento cervical, com comprometimento linfonodal, radioterapia adjuvante e margens livres que apresentaram ou não recidiva após um período mínimo de 2 anos. Os resultados encontrados necessitam de validação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Assim, devido à necessidade de confirmação dos dados de expressão gênica obtidos através da técnica de *cDNA Microarray* durante a tese anteriormente citada, o objetivo do presente trabalho é validar as alterações de expressão gênica relacionadas à ocorrência de recidivas em pacientes de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar, pela técnica de *PCR* quantitativa em tempo real, as alterações de expressão gênica relacionadas à ocorrência de recidivas em pacientes de CECP.

- Validar, pela técnica de imunistoquímica em TMAs (*Tissue Microarray*) de pacientes de CECP, a expressão protéica somente dos genes que se apresentarem diferencialmente expressos na análise da *PCR* quantitativa em tempo real.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram analisados blocos de parafina (armazenados no Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo) e *RNA* total proveniente do Banco de Tumores de amostras cirúrgicas de pacientes, coletadas no Hospital AC Camargo, portadores de carcinoma epidermóide de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe, livres de tratamento prévio. Os pacientes foram convidados a participar do estudo e todos assinaram um consentimento pós-informado. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer com o número 681/05 – extensão durante a reunião de 12 de maio de 2008.

Posteriormente foram adicionadas amostras, provenientes do projeto doutorado BARRETO (2009), de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de laringe, também livres de tratamento. A Tabela 3 descreve a quantidade das amostras utilizadas e suas topografias.

**Tabela 3** - Amostras de CECP utilizadas no estudo.

Localização Topográfica	Recidiva Positiva	Recidiva Negativa
Cavidade Oral	13	12
Orofaringe	8	13
Hipofaringe	1	2
Laringe	13	31
Total	35	58

As amostras foram previamente analisadas nos projetos de doutorado COLÓ (2009) e BARRETO (2009) através da análise de *cDNA Microarray*. Através desses experimentos foi comparada a expressão gênica de amostras de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que apresentaram recidiva loco-regional ou à distância e em pacientes que não apresentaram recidiva.

## **4.2 METODOLOGIA EMPREGADA**

### **4.2.1 Preparo do RNA**

O RNA total foi extraído pelo método do Trizol® (*Invitrogen*, EUA) durante os experimentos dos projetos de doutorado citados anteriormente, com o auxílio do homogenizador Polytron (*Kinematica*, AG, Suíça). Após a microdissecção manual, as amostras foram trituradas em presença de Trizol (*Invitrogen*, EUA) e depois de 5 minutos de incubação foi adicionado 20% do volume de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foram submetidas à centrifugação para separação das fases orgânica e aquosa. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionada igual volume de isopropanol. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas para precipitação do RNA, o qual foi solubilizado em água DEPC. A qualidade do RNA foi avaliada através de leitura de absorbância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 208 nm em espectrofotômetro (*Genequat*, França) e em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes.

#### 4.2.2 *PCR* quantitativa em tempo real

→ **Síntese de *cDNA*:** Para a síntese de *cDNA* foram realizadas 2 reações por amostra, iniciando cada uma com 2 µg de *RNA* total e 0,5 µg de oligo-dT<sub>15</sub> em volume final de 5 µl, a 70°C por 10 min. A transcrição reversa ocorreu a 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP mix (Eppendorf, Alemanha), 1X 1st Strand Buffer, 20 unidades de *RNAsin* e 1 µl de *Improm II* (Promega, EUA) no volume final de 20 µl a 42°C por 1 hora, seguido de incubação a 70°C por 15 min. Como controle negativo foi feita uma reação na qual o *RNA* foi substituído por água. A eficácia da reação foi avaliada através de uma reação de *PCR* comum para o gene *p53*, onde cada iniciador está localizado em um exon diferente, e o produto foi fracionado em gel de agarose 1%. Todas as amostras foram submetidas à reação de amplificação, inclusive o controle negativo da síntese de *cDNA*, sendo que este não deve apresentar produto de amplificação uma vez que a transcrição reversa foi realizada sem a presença de *RNA*. Como controle negativo das reações de *PCR* foi feita uma reação na qual a amostra de *cDNA* foi substituída por água. Para avaliar a eficiência da reação e também servir de referência para a avaliação da contaminação das amostras por *DNA* genômico foi feito um controle positivo utilizando *DNA* genômico (*DNA* extraído da linhagem *HEK 293*). Este controle deve apresentar um tamanho de banda de cerca de 600 pares de bases, enquanto as amostras contendo o *cDNA* devem apresentar um produto de cerca de 300 pares de bases, uma vez que não possuem sequência intrônica.

→ **Oligonucleotídeos iniciadores:** Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes selecionados (Tabela 4) foram desenhados através do *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*, utilizando como parâmetros conteúdo CG entre 30 e 80%, temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C, iniciadores que não possuíssem capacidade de anelamento entre si ou de formar estrutura secundária e *amplicon* entre 50 a 150 pares de base. Além desses parâmetros, os iniciadores foram desenhados em *éxons* diferentes, evitando a possibilidade de amplificação simultânea a partir de *DNA* genômico contaminante de amplicon de mesmo tamanho do obtido a partir do transcrito. Foram escolhidos *éxons* comuns às variantes de *splicing* alternativo e localizados na extremidade 3' do gene para garantir maior representatividade de todos os transcritos.

**Tabela 4** - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de *PCR* quantitativa dos genes normalizadores e genes selecionados na análise de vias e de módulos alterados em CECP.

Genes	Sequência do iniciador FW	Sequência do iniciador RV	Concentração final ( $\eta$ M)	Eficiência
<i>AREG</i>	CGACAAGAGAATGGAAATGTACATG	TTATGGCTATGACTTGGCAGTGA	100	1,86
<i>BST2</i>	AGCGCTCTGCTGCAGTGA	AGGACGGACCTTCCAAGATGT	400	1,85
<i>CCL20</i>	TCCAAAACAGACTTGGGTGAAA	CCATTCCAGAAAAGCCACAGTT	100	2,11
<i>EGLN3</i>	AGAAGCCAAAAAGAAATTCAGGAA	GAGCACGGTCAGTCTTCAGTGA	100	1,84
<i>IL1F9</i>	AACAGCCCACATTGCAGCTAA	GCTCGGGTTGGCCATACA	200	1,88
<i>INHBA</i>	GGAGCAGACCTCGGAGATCA	CAGCGTCTTCCTGGCTGTTC	25	2,27
<i>KLK6</i>	TGAGAAGTACGGGAAGGATTCC	TCGGAGGTGGTCTCCACATAC	100	1,87
<i>BCR2</i>	CCTTCGACGTCAATAACAAGGA	CCTGCGATGGCGTTCAC	200	1,97
<i>HBMS</i>	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC	100	1,96
<i>HPRT1</i>	CCCACGAAGTGTGGATATAAGC	GGGCATATCCTACAACAACTTGTC	400	1,88

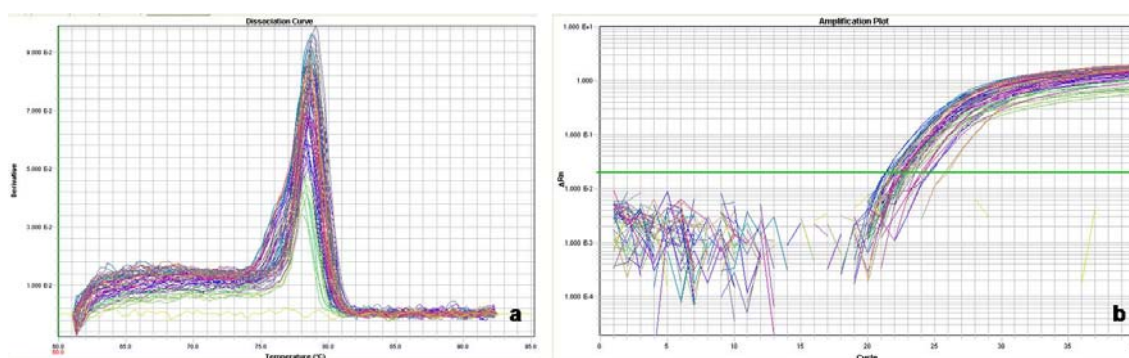


→ **Reação:** As reações de *PCR* quantitativa em tempo real foram realizadas em um termociclador ABIPRISM® 7300 Sequence Detection System (7300 System), monitorando a fluorescência do corante SYBR® Green I. Entretanto, como o SYBR® Green I se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação (ou seja, produtos inespecíficos amplificados, como dímeros de iniciadores ou o pareamento inadequado dos iniciadores, irão contribuir para a quantificação da fluorescência), é necessária uma cuidadosa padronização e uma otimização das reações para evitar resultados “mascarados” pela incorporação do corante a moléculas de fita dupla não esperada; a padronização foi feita usando diferentes quantidades dos iniciadores e de *cDNA*, e a otimização através da análise das curvas de *melting* (que deve apresentar apenas um pico, na temperatura correspondente à  $T_m$  do amplicon esperado) e de géis de agarose e acrilamida, segundo o manual da Applied Biosystems.

Todas as reações de padronização assim como as reações para medir a expressão gênica nas amostras estudadas foram realizadas em duplicata com 1X SYBR Green *PCR* Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de *cDNA* diluído 10 vezes (exceto curva padrão) e os iniciadores nas concentrações selecionadas (Tabela 4), no volume final de 20 µl. Para os controles negativos de cada iniciador foi utilizado água estéril ao invés de *cDNA*. As reações foram realizadas no termociclador ABI Prism® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems), a 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C 15 segundos e 60°C 1 minuto, e finalizando com a curva de

dissociação realizada a 95°C 15 segundos, 60°C 15 segundos e 95°C 15 segundos.

Após o termino da reação, as curvas de dissociação (Figura 3a) foram analisadas quanto a amplificação de *DNA* genômico, dímeros de iniciadores e variantes de *splicing*. Com auxílio das curvas de amplificação ou *Amplification plot* (Figura 3b), era ajustado na fase exponencial do gráfico o *threshold* ou limiar de intensidade de fluorescência na qual seriam tomados os valores de ciclos ou Ct (*cycle threshold*) de cada reação. Foram consideradas aceitáveis as duplicatas com desvio padrão menor que 0,5.

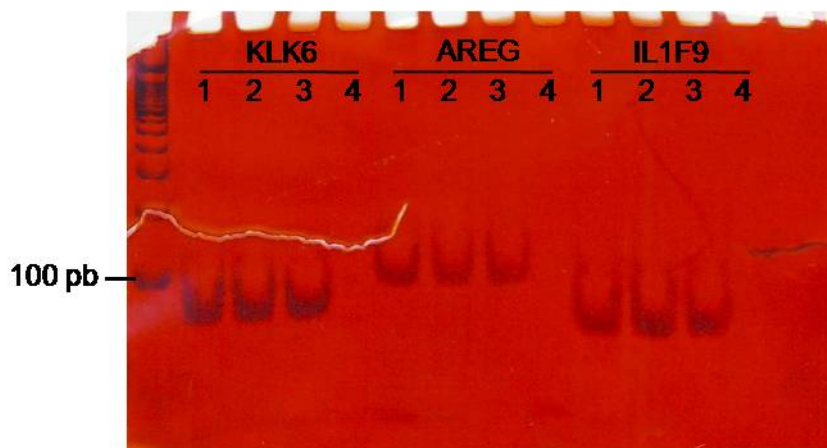


**Legenda:** **a.** Curva de dissociação do *amplicon* gerado com iniciadores do gene *AREG*. Na abscissa está representada a temperatura. Na ordenada está representada a intensidade de fluorescência. **b.** Curva de amplificação de amostras com iniciadores do gene *AREG*. Na abscissa estão representados os ciclos de amplificação. Na ordenada está representada a intensidade de fluorescência.

**Figura 3** - Curvas para análise de resultados de amplificação das reações de *PCR* quantitativa.

As reações de amplificação foram padronizadas inicialmente variando a concentração do iniciador com reações de concentração final de 400, 200 e 100  $\eta$ M e os produtos foram fracionados em gel de acrilamida 8% com o 100pb (100 pares de bases) como marcador de peso molecular (Figura 4).

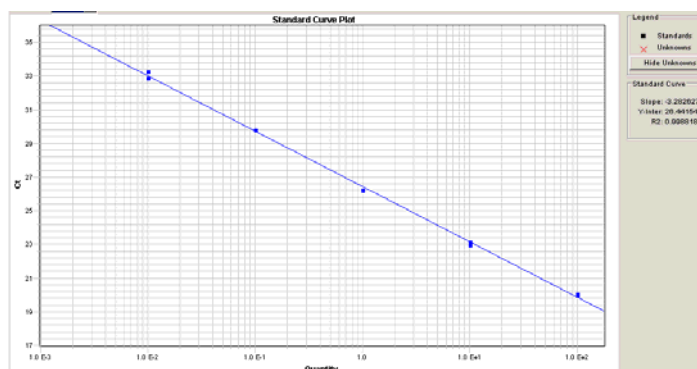
Foi escolhida a concentração mais adequada para cada par de iniciadores considerando-se menor Ct, maior intensidade da banda no gel e ausência de dímeros de iniciadores.



**Legenda:** 1. Concentração final de 400  $\eta$ M. 2. Concentração final de 200  $\eta$ M. 3. Concentração final de 100  $\eta$ M. 4. Controle negativo.

**Figura 4** - Produto de *PCR* quantitativa para os genes *KLK6*, *AREG*, *IL1F9* fracionado em gel de acrilamida 8%.

Em seguida foram realizadas reações para determinar a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores. Para isso foi construída uma curva padrão (Figura 5) utilizando quantidades decrescentes de *cDNA*, obtidas diluindo seriadamente 10 vezes a cada etapa (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000). A inclinação ou *slope* (*S*) da curva foi utilizado para o cálculo da eficiência (tabela 5) segundo a fórmula proposta por Rasmussen et al. (2001), onde Eficiência =  $10^{1/Slope}$ .



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

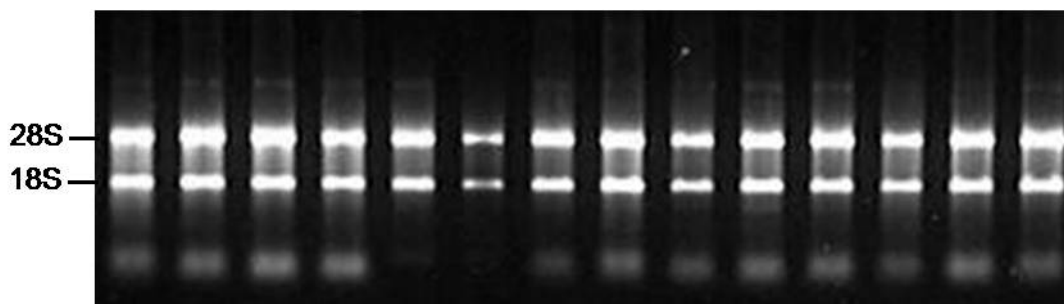
**Figura 5** - Curva padrão de reações de *PCR* quantitativa.

As reações de *PCR* quantitativa foram realizadas para as amostras utilizadas nos experimentos de *Microarray* e em cada placa foi incluído o *RNA* referência, como uma amostra calibradora. O *RNA* referência corresponde a um conjunto de *RNAs* de 15 linhagens celulares (Quadro 2), que foram cultivadas segundo instruções da ATCC (American Type Cell Collection, [www.atcc.org](http://www.atcc.org)) e o *RNA* total foi extraído pelo método do Trizol® (*Invitrogen*, EUA).

**Quadro 2** - Linhagens celulares selecionadas para compor o *RNA* referência.

	<i>Linhagens para RNA referência</i>
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDu	Carcinoma Epidermóide de
GM 637	Fibroblasto
H 146	Carcinoma de Pulmão
H 1080	Fibrossarcoma
HB4 $\alpha$	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Rim embrionário Humano
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

A qualidade dos *RNAs* extraídos de cada linhagem foi avaliada através da observação da intensidade das bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S. Para isso foram fracionados 2 $\mu$ g de cada *RNA* total previamente desnaturado com tampão contendo uréia 7M em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo. O gel foi fotografado sob luz UV (Figura 6). A intensidade da banda 28S aparece sempre maior do que a da banda 18S, indicando que estes *RNAs* apresentam qualidade satisfatória para realização dos experimentos.



**Legenda:** Avaliação da qualidade das amostras de RNA total extraídas das linhagens celulares (Daudi, DLD-1, DU 145, FaDU, GM 637, H 146, H 1080, Jurkat, Saos-2, SK-BR-3, SK-MEL-28, T24, T98G) que compõe o RNA referência, através de fracionamento em gel de agarose 1% em condições desnaturantes e corado pelo brometo de etídeo.

**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose de RNA total de amostras de linhagens celulares do RNA referência.

Para os genes normalizadores (*BCR2*, *HMBS* e *HPRT*) foi calculado o  $\Delta Ct$  (eficiência iniciador <sup>(Ct<sub>referência</sub>-Ct<sub>amostra</sub>)</sup>). Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do fator de normalização através do software *GeNorm*® (VANDESOMPELE et al. 2002). A expressão relativa foi calculada baseando-se na fórmula proposta por PFAFFL et al. (2001), adicionando-se o fator de normalização:

$$\text{Expressão}_{\text{amostra}} = \frac{\text{Eficiência}_{\text{gene-alvo}}^{(Ct_{\text{referência}} - Ct_{\text{amostra}})}}{\text{Fator de normalização}}$$

#### 4.2.3 Ensaios de Imunoistoquímica

##### → Confecção de *Tissue Microarrays* (TMA)

As lâminas de TMA utilizadas para o estudo imunoistoquímico realizado por esse trabalho foram disponibilizadas pelo departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. Dos pacientes representados

nos dois TMAs analisados, somente 11 são representantes das amostras analisadas por *PCR* quantitativa, sendo 6 pacientes que apresentaram recidiva positiva e 5 pacientes que apresentaram recidiva negativa. Entretanto todos os pacientes representados nos TMAs foram analisados.

Após a delimitação das áreas doadoras nos blocos parafinados, de acordo com a marcação feita previamente nas lâminas submetidas à revisão histopatológica, foram obtidas biópsias cilíndricas com 1 e 2 mm de diâmetro utilizando um *Tissue Microarray* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Todas as amostras foram coletadas em duplicata, transferidas para os blocos de parafina receptores e dispostas em fileiras paralelas. O primeiro spot dos blocos de TMA foi preenchido por uma biópsia de tecido normal, apenas para marcar a fileira inicial de cada *array*.

Em seguida, foram obtidos cortes de 4 $\mu$ m de cada bloco de TMA, que foram transferidos para lâminas de vidro e corados pelo método HE para revisão patológica. Após a confirmação da representatividade de cada tipo histológico, os blocos construídos foram totalmente seccionados e o material transferido para lâminas de vidro para a realização das reações imunoistoquímicas com os anticorpos selecionados.

#### → **Reações de Imunoistoquímicas e anticorpos**

Todas as reações de imunoistoquímica foram realizadas pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo, conforme protocolo de reações descrito a seguir.

Para o anticorpo analisado foram utilizadas duas lâminas diferentes de TMA, nas quais as amostras encontram-se em duplicata. Foram feitos cortes de 3µm de material fixado em formalina tamponada e incluída em parafina em lâminas revestidas (Superfrost Plus, Easy Path). Após a desparafinização em xilol e hidratação em banhos seriados de etanol, as lâminas foram tratadas em tampão citrato 10mM pH 6.0 em panela de pressão para recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, e após lavagem em água destilada e PBS, os cortes foram incubados com anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos, em tampão PBS com BSA 1% e azida sódica 0.1% por 30 minutos a 37°C e 18 horas a 4°C em câmara úmida. O anticorpo anti-*EGLN3* (anti-*PHD3*) foi adquirido com o financiamento CEPID-FAPESP, sua diluição e controle estão listados na Quadro 3.

Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com kit de amplificação e cromógeno de revelação, sendo montadas com lamínulas em meio apropriado para cada sistema (Quadro 4). Todos os reagentes estavam disponíveis para uso no Departamento de Anatomia Patológica. As lâminas de TMA foram analisadas no equipamento ACIS III®, Dako, com a supervisão do Dr. Fernando Augusto Soares.

**Quadro 3** - Painel do anticorpo utilizado

Anticorpos	Clones	Fabricantes	Diluições	Controles positivos	Kit amplificação
Anti- <i>PHD3</i>	Policlonal feito em coelho	Abcam, código ab30782	1/300	Fígado	A



**Quadro 4 - Sistemas de amplificação e cromógenos de detecção**

	Kits de amplificação	Cromógenos	Coloração observada	Meios de montagem
A	StreptABC / HRP, Duet mouse / rabbit, DakoCytomation, código K0492, Glostrup, Dinamarca	DAB (3, 3" Diaminobenzidine Tetrahydrochloride), Sigma, código D-5637, St Louis, EUA – 60mg% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DMSO por 5 min a 37°	Marron dourado	Entellan Neu Merck, Darmstadt, código 1.07961, Alemanha

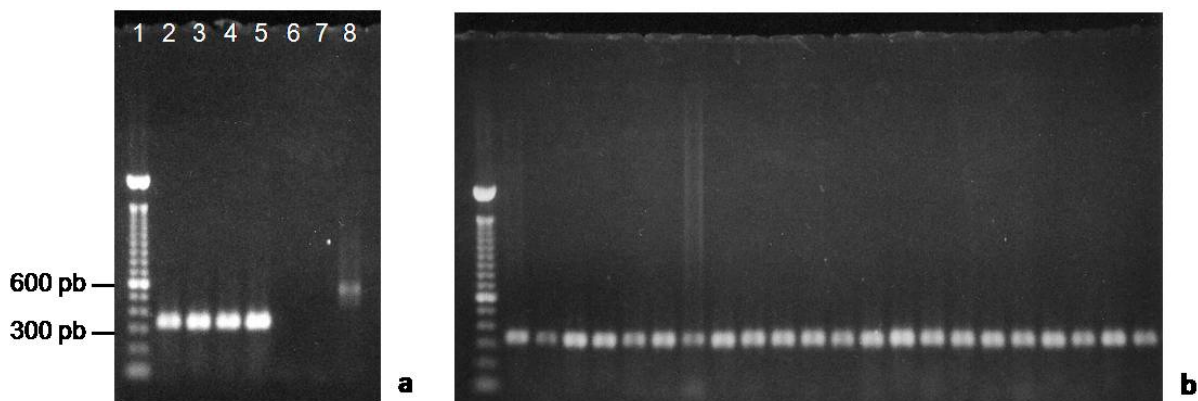
### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste Kolmogorov-Smirnov para saber se os grupos analisados apresentavam distribuição normal. Como os grupos não apresentaram distribuição normal foi necessário realizar testes não paramétricos. Os grupos analisados nesse projeto são não pareados então foi realizado o teste Mann-Whitney. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentaram  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SÍNTESE DO CDNA

A eficácia da reação de transcriptase reversa foi avaliada através de uma reação de *PCR* comum para o gene p53 e o produto foi fracionado em gel de agarose 1%. A Figura 5 mostra exemplos de géis de agarose 1% utilizados para verificar a presença do amplicon esperado e a ausência de contaminação por *DNA* genômico; as amostras que não apresentassem bandas não seriam utilizadas nos experimentos de *PCR* quantitativa em tempo real, no entanto, todas as amostras apresentaram bandas e, por isso, foram utilizadas na *PCR* quantitativa (Figura 7). A primeira canaleta apresenta o marcador de peso molecular correspondente a 100 pares de bases utilizado. A Figura 7b mostra que não houve amplificação da banda correspondente ao *DNA* genômico, o que indica que não ocorreu contaminação por *DNA* genômico em nenhuma amostra.



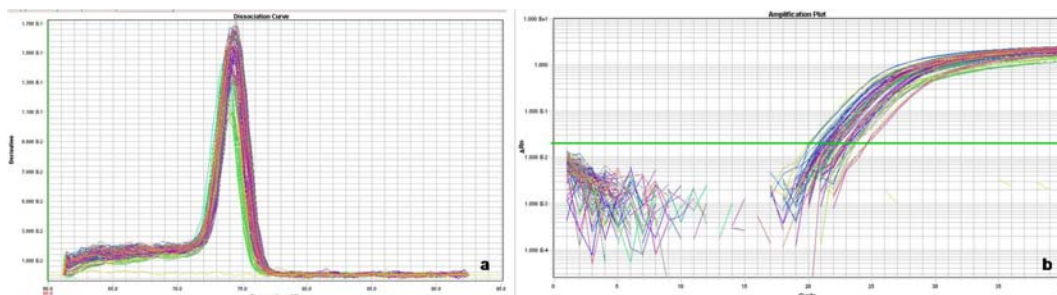
**Legenda: a.** Canaleta 1: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2, 3, 4 e 5: produto de *PCR* das amostras analisadas; canaleta 6: reação de *PCR* na qual a amostra foi substituída pelo produto do controle negativo da RT; canaleta 7: controle negativo da *PCR*, reação sem *DNA*; canaleta 8: controle positivo da *PCR* contendo *DNA* genômico. **b.** Exemplo do produto da *PCR* das amostras que foram utilizadas.

**Figura 7** - Gel de agarose 1% de *cDNA* das amostras analisadas onde foram fracionados os produtos da reação de *PCR* para o gene p53.

## 5.2 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

### 5.2.1 Dados das reações

Após o termino das reações, as curva de dissociação (Figura 8a) foram analisadas quanto a amplificação de *DNA* genômico, dímeros de oligonucleotídeos iniciadores e variantes de *splicing*. Com auxílio das curvas de amplificação (Figura 8b), era ajustado na fase exponencial do gráfico o *threshold* ou limiar de intensidade de fluorescência na qual seriam tomados os valores de ciclos ou Ct (*cycle threshold*) de cada reação. Foram consideradas aceitáveis as duplicatas com desvio padrão menor que 0,5.



**Legenda:** **a.** Curva de dissociação do *amplicon* gerado com iniciadores do gene *EGLN3*. Na abscissa está representada a temperatura. Na ordenada está representada a intensidade de fluorescência. **b.** Curva de amplificação de amostras com iniciadores do gene *EGLN3*. Na abscissa estão representados os ciclos de amplificação. Na ordenada está representada a intensidade de fluorescência.

**Figura 8** - Curvas para análise de resultados de amplificação das reações de *PCR* quantitativa para o gene *EGLN3*.

Com os valores de *Ct* (*cycle threshold*) foi calculada a média das duplicatas de cada amostra e esta média foi comparada com a média dos *Cts* das duplicadas da amostra referência. A expressão relativa foi calculada baseando-se na fórmula proposta por PFAFFL et al. (2001), adicionando-se o fator de normalização:

$$\text{Expressão}_{\text{amostra}} = \frac{\text{Eficiência}_{\text{gene-alvo}}^{(Ct_{\text{referência}} - Ct_{\text{amostra}})}}{\text{Fator de normalização}}$$

O valor de expressão relativa de cada gene foi analisado estatisticamente pelo programa GraphPad Prism 5.

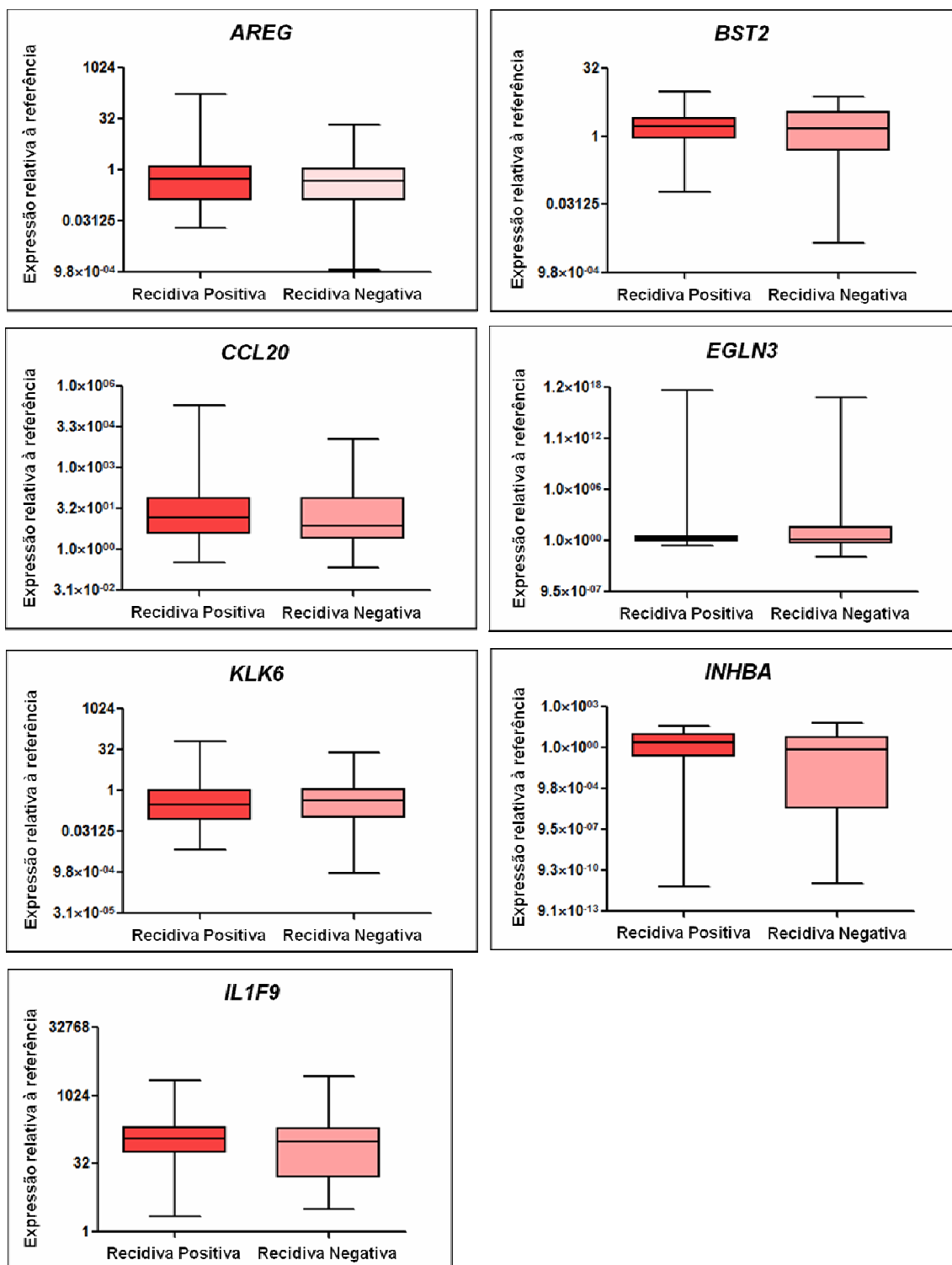
### 5.2.2 Análise das reações

Ao analisar todas as 93 amostras de CECF (representantes de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe) nenhum dos sete genes estudados mostrou-se diferencialmente expresso, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 9).

Como o maior n de amostras foi de CE de laringe (44 pacientes, sendo que 13 apresentaram recidiva positiva e 31, recidiva negativa), segregamos essa região topográfica da demais.

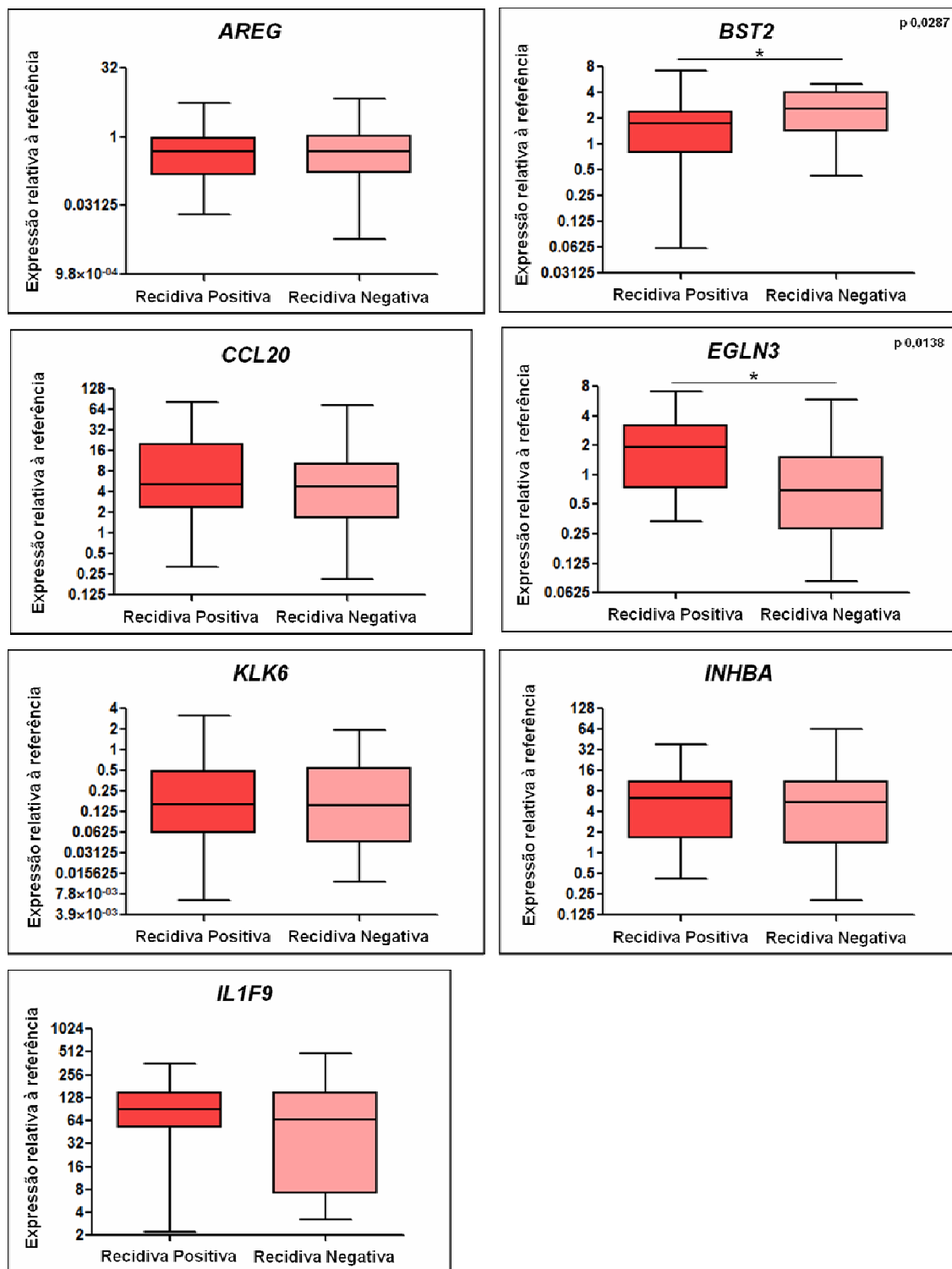
Analisando o perfil de expressão das amostras referentes à cavidade oral, orofaringe e hipofaringe os genes *BST2* e *EGLN3* apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0287$  e  $p = 0,0138$ , respectivamente, teste Mann-Whitney) (Figura 10). O gene *BST2* encontra-se mais expresso nos pacientes com recidiva negativa em comparação com os pacientes com recidiva positiva (razão 0,6876). Já o gene *EGLN3* encontra-se mais expresso nos pacientes com recidiva positiva em comparação com os pacientes com recidiva negativa (razão 1,7937).

Nas amostras dos pacientes de CE de laringe, dos sete genes analisados por *PCR* quantitativa somente um foi estatisticamente significativo *BST2* ( $p = 0,0352$ , teste Mann-Whitney) (Figura 11). Esse gene encontra-se mais expresso nos pacientes com recidiva positiva em comparação com os pacientes com recidiva negativa (fold 2,1545).



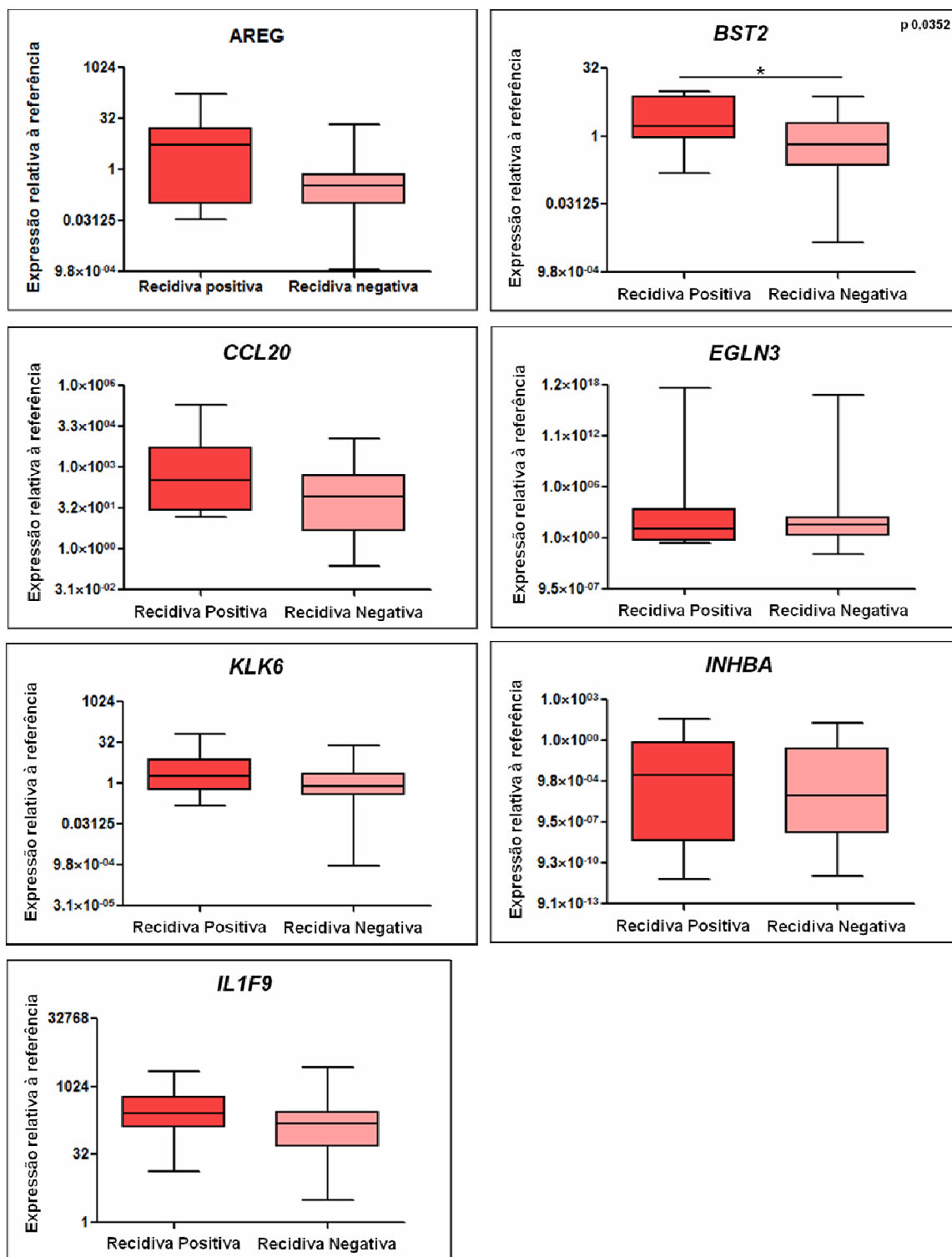
**Legenda:** *AREG* p 0,6649. *BST2* p 0,6949. *CCL20* p 0,2929. *EGLN3* p 0,7484. *KLK6* p 0,9549. *INHBA* p 0,0922. *IL1F9* p 0,2992. Teste Mann-Whitney. Gráfico modificado para log2.

**Figura 9** - Expressão relativa dos genes analisados por *PCR* quantitativa, no conjunto de todas as topografias estudadas.



**Legenda:** *AREG* *p* 0,8395. *BST2* \**p* 0,0287. *CCL20* *p* 0,4240. *EGLN3* \**p* 0,0138. *KLK6* *p* 0,9575. *INHBA* *p* 0,7572. *IL1F9* *p* 0,3112. Teste Mann-Whitney. Gráfico modificado para log2.

**Figura 10** - Expressão relativa dos genes analisados por *PCR* quantitativa, todas as topografias exceto laringe.



**Legenda:** *AREG* p 0,1166. *BST2* \*p 0,0352. *CCL20* p 0,1029. *EGLN3* p 0,8584. *KLK6* p 0,0945. *INHBA* p 0,8796. *IL1F9* p 0,2378. Teste Mann-Whitney. Gráfico modificado para log<sub>2</sub>.

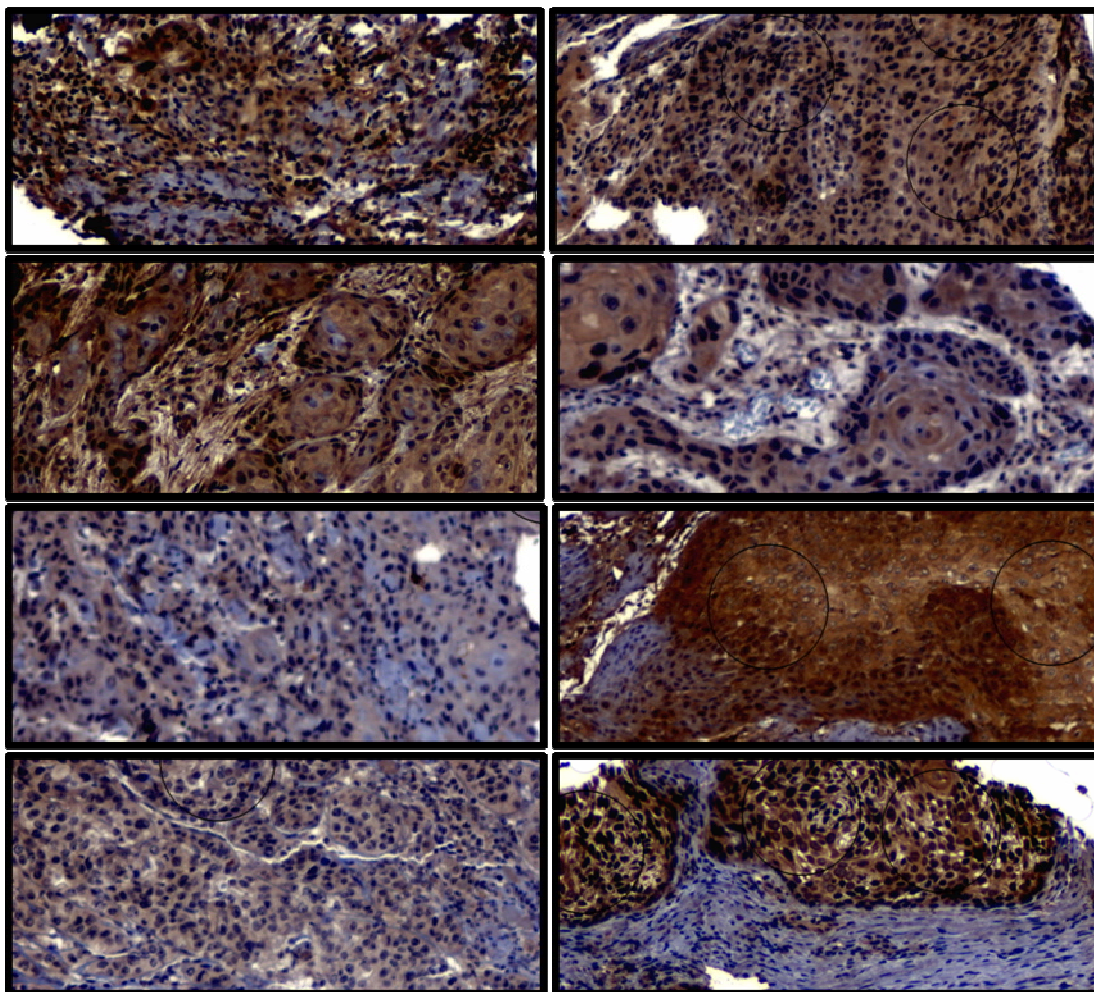
**Figura 11** - Expressão relativa dos genes analisados por *PCR* quantitativa, nas amostras de carcinoma epidermóide de laringe.



### 5.3 IMUNOISTOQUÍMICA

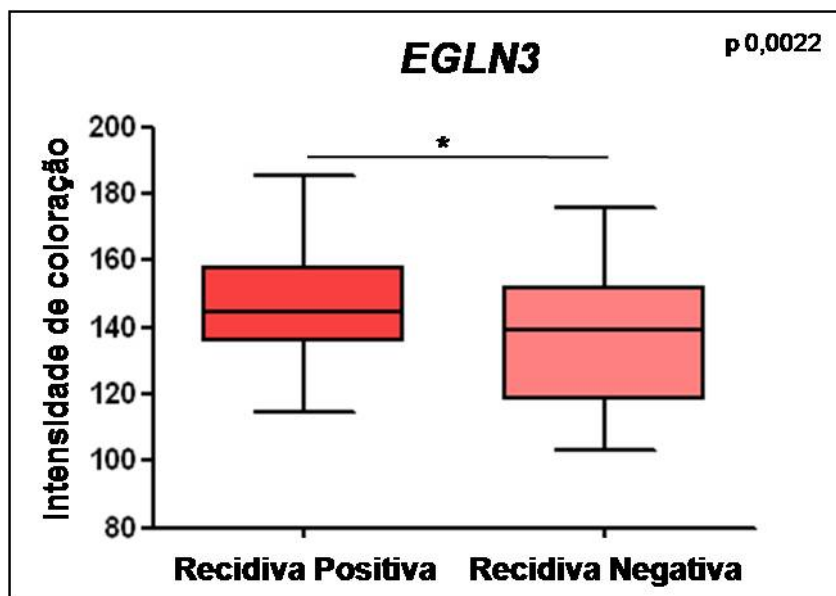
Os dois TMAs analisados compreendem 202 pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral. Desses, 133 pacientes apresentaram recidiva loco-regional e 69 pacientes não apresentaram recidivas, após um período de 2 anos.

Na Figura 12 é possível observar uma coloração citoplasmática mais intensa nos exemplos do grupo recidiva positiva em comparação com o grupo recidiva negativa. E a Figura 13 demonstra que essa diferença de coloração entre os grupos comparados apresenta-se estatisticamente significativa ( $p$  0,0022, teste Mann-Whitney).



**Legenda:** Imunoistoquímica realizada com anticorpo *EGLN3*. Na coluna da esquerda estão 4 fotomicrografias de 4 pacientes distintos do grupo Recidiva Negativa e na coluna da direita estão 4 fotomicrografias de 4 pacientes distintos do grupo Recidiva Positiva. Nota-se que a coloração citoplasmática é mais intensa no grupo Recidiva Positiva ( $p=0,0022$ , Teste Mann-Whitney), à direita. As fotos foram tiradas em aumento 200 vezes.

**Figura 12** - Fotomicrografias de cortes histológicos de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral.



**Legenda:** Os grupos comparados apresentaram diferença estatisticamente significativa (p0,0022, teste Mann-Whitney).

**Figura 13** - Perfil da marcação de EGLN3 nas amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 ASPECTOS MOLECULARES DO CECP EM CASOS COM RECORRÊNCIA LOCO-REGIONAL**

O carcinoma pode ser definido como a perda da homeostasia celular, em decorrência do acúmulo de mutações do DNA genômico de uma célula. A manifestação clínica dos tumores é bastante heterogênea, mesmo para tumores de uma mesma topologia. Esta heterogeneidade é consequência da variedade de mutações acumuladas pelas células tumorais após o início do processo de oncogênese.

Na região da cabeça e pescoço, o revestimento contínuo que recobre as vias aerodigestivas superiores é constituído pelo epitélio estratificado escamoso, e sua transformação pode originar o Carcinoma Epidermóide. Os Carcinomas Epidermóides das diferentes topografias de cabeça e pescoço são doenças clinicamente distintas, no entanto apresentam semelhanças quanto à morfologia e etiologia. Nesse estudo foi possível observar uma diferença de expressão gênica entre as topografias analisadas: cavidade oral, orofaringe e hipofaringe em comparação com a laringe, quando analisadas em relação à recorrência loco-regional da doença.

Atualmente, a escolha do tratamento do CECP continua baseada principalmente nos achados histopatológicos e radiográficos, porém, esse sistema pode falhar em estratificar os pacientes de acordo com o risco de

recorrências (DE BREE et al. 2000), já que, de forma geral, os pacientes com Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço respondem ao tratamento de formas heterogêneas.

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

Um desses estudos moleculares foi realizado em 2009 com um total de 121 casos de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Foi comparado o perfil de expressão gênica num grupo de 55 pacientes tratados cirurgicamente, com esvaziamento cervical, com comprometimento linfonodal, radioterapia adjuvante e margens livres que apresentaram ou não recidiva após um período mínimo de 2 anos. Foi observada, pela técnica de *cDNA Microarray*, alteração em módulos funcionais relacionados à sinalização célula-célula, estando ativo nos pacientes com recidiva positiva e inativo nos pacientes com recidiva negativa (Tabelas 1 e 2) e foram obtidos dados da expressão de sete genes relacionados aos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço que apresentaram recidiva loco-regional e aos pacientes que não apresentaram recidiva (Quadro 1) (COLÓ 2009).

Dessa forma, com o objetivo de estudar aspectos moleculares do Carcinoma Epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço e identificar alterações relacionadas ao comportamento desses tumores, foi analisado o perfil de expressão gênica de 93 amostras de CECP.

A busca de marcadores de recidivas é um processo complexo, pois envolve o tipo de tratamento, o tempo de seguimento, e também a capacidade do tumor de invadir tecidos e de sobreviver fora do sítio primário. Por exemplo, RICKMAN et al. (2008) descreveu uma assinatura de metástases, mas os 156 genes que se encontravam representados na lâmina de *cDNA Microarray* de um total de 729 genes encontrados pelo autor não tiveram o mesmo poder preditor nas amostras utilizadas na tese de COLO (2009).

Através do emprego do método de vias e módulos alterados, observou-se que no grupo de casos que apresentou recidiva, o módulo de Sinalização célula-célula está ativo e inativo no grupo sem recidivas (COLÓ 2009). Esse módulo se refere a qualquer processo de transferência de informação de uma célula a outra e contém principalmente genes de mediadores inflamatórios (IL1F9 e CCL20) e ligantes de receptores (AREG). IL1F9 está localizado no mesmo *locus* que IL1B (NICKLIN et al. 2002), sugerindo que surgiram do mesmo gene ancestral e foram duplicados posteriormente. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam a expressão desta citocina em queratinócitos (MAGLOTT et al. 2005). BST2 (bone marrow stromal cell antigen 2) é um fator presente em células estromais de medula óssea que participam no desenvolvimento de células B, porém sua função não é ainda conhecida em detalhes (MAGLOTT et al. 2005). Em cabeça e pescoço, BST2 está mais expresso em relação ao tecido normal (SILVEIRA et al. 2008).

Segundo os resultados da *PCR* quantitativa, *BST2* está mais expresso nos casos sem recidiva (Figura 10) nas topografias cavidade oral, orofaringe, e hipofaringe quando analisadas em conjunto; e encontra-se mais expresso nos casos com recidiva (Figura 11) na análise de laringe, porém seu significado não está esclarecido. O gene *EGLN3* encontra-se mais expresso nos casos com recidiva positiva (Figura 10) nas topografias cavidade oral, orofaringe e hipofaringe quando analisadas em conjunto. Nos ensaios de imunistoquímica, sua proteína mostrou-se mais expressa nos casos com recidiva positiva (Figuras 12 e 13). Esse gene codifica para a proteína *PHD3*, a qual apresenta comportamento duplo. Em normóxia hidroxila HIF-1 $\alpha$  levando à degradação via proteassomo (GINOUVÈS et al. 2008). E durante hipóxia crônica, situação que pode ocorrer em tumores, *PHD3* encontra-se com expressão aumentada e maior atividade. Nesse caso, a “desensibilização” massiva de HIF-1 $\alpha$  protege as células contra morte por necrose, porém o mecanismo responsável ainda não está esclarecido (GINOUVÈS et al. 2008). Portanto, este gene pode ser um importante indicador de resistência à radioterapia já que permite às células sobrevivência em microambientes em hipóxia por períodos prolongados.

Esses genes *BST2* e *EGLN3* foram identificados também em trabalhos que demonstraram associação com acometimento linfonodal (O'DONNELL et al. 2005) e profundidade de infiltração (TORUNER et al. 2004), mas não com a ocorrência de recidivas pós-tratamento.

Nos estudos de expressão gênica já publicados em CECp, os genes relacionados ao comprometimento linfonodal e metástases seriam

principalmente os ligados às junções oclusivas, integrinas, vias de sinalização de cálcio, VEGF, p53, apresentação de antígenos, quimiocinas e extravasamento de leucócitos (YU et al. 2008). O cenário formado pelos genes alterados nesse estudo mostra que a biologia do CECP é também caracterizada por alterações pouco estudadas nesse tumor (alterações em *BST2*, *EGLN3*).

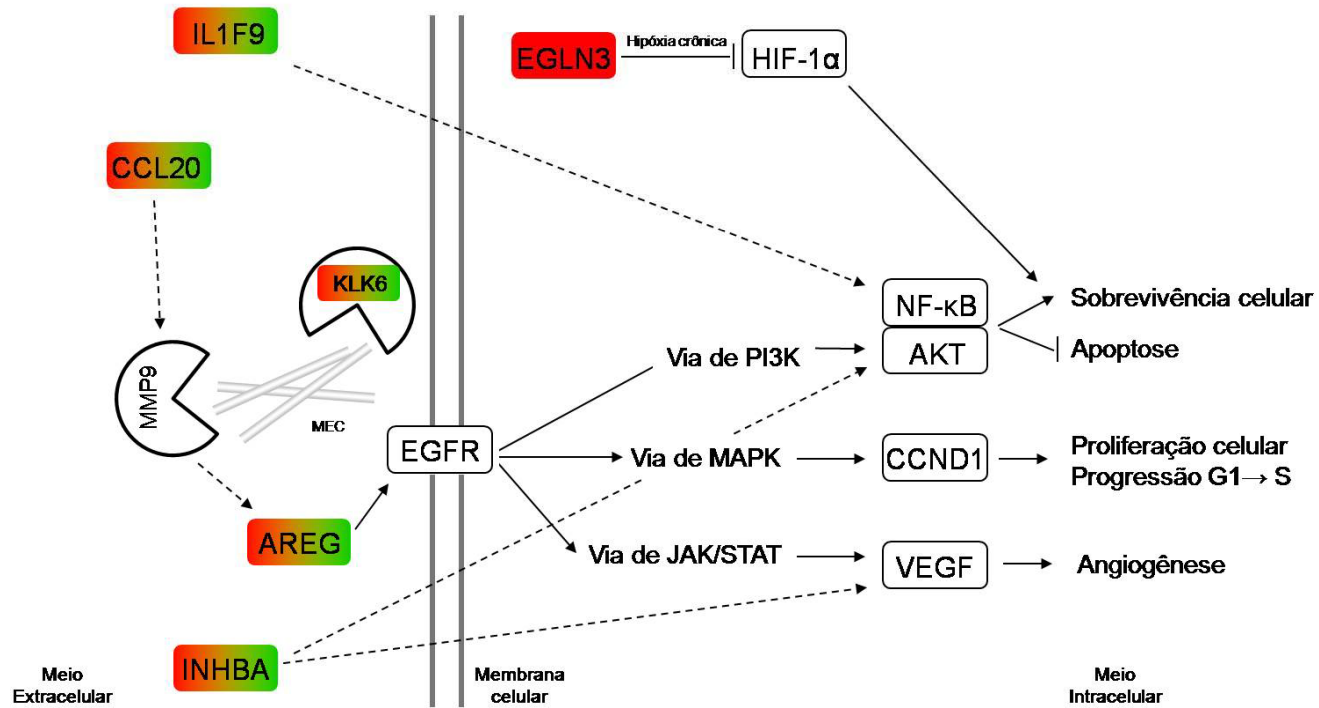
## 6.2 COMPORTAMENTO DOS GENES ESTUDADOS

Segundo os dados da literatura citados e as vias apresentadas pelo KEGG, podem ser apontados vários pontos de sinalização entre os genes pertencentes a módulos alterados, mostrando a comunicação da célula tumoral com o microambiente (Figura 14). A ligação de CCL20 ao seu receptor CCR6 acarreta na atividade de MMP, que libera moléculas de anfirregulina (AREG) que estavam embebidas na MEC; a anfirregulina liberada no meio extracelular se liga a EGFR, ativando toda a cascata clássica de EGF: fosforilação das tirosinas, ativação da via de MAP quinase, proliferação, migração, ativação do mediador de sobrevivência Akt/PKB e ativação de VEGF promovendo angiogênese no microambiente tumoral (GSCHWIND et al. 2003; KEATES et al. 2007). IL1F9 desencadeia sinalização que promove sobrevivência celular através de inibição e degradação de I $\kappa$ B (DIDONATO et al. 1995), seguida de translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, ativando-o (TOWNE et al. 2004). INHBA ativa Akt, inibindo apoptose e aumentando a sobrevivência celular e estimula a



expressão gênica de VEGF em carcinoma hepatocelular (WAGNER et al. 2004; DO et al. 2008). EGLN3, em microambientes submetidos à hipóxia crônica, inibe HIF-1 $\alpha$ , conseqüentemente aumenta a sobrevivência celular, uma vez que protege as células contra necrose (GINOUVÈS et al. 2008).

A ativação incontrolada das vias PI3K/ AKT/ mTOR contribui para o desenvolvimento e progressão do CECP e é um importante alvo para neutralizar a resistência à radioterapia e à quimioterapia (CHUNG et al. 2004; BUSSINK et al. 2008). Deleção de PTEN e mutações no gene PI3K apresentam capacidade transformacional *in vitro* e *in vivo*, conseqüentemente, restauração da mutação ou ausência de atividade de PTEN pode ser um alvo para inibição de AKT. Inibidores de protease regulam negativamente a fosforilação e expressão de PI3K ativo, que é responsável pela radioresistência em CECP. Ativação de AKT é um possível mecanismo de resistência aos inibidores de EGFR, assim, a combinação de inibidores de AKT e agentes anti-angiogênicos podem ser úteis na conduta de tratamento dos pacientes com CECP (CHUNG et al. 2004; MATTA e RALHAN 2009; THOMAS e GRANDIS 2009).



**Figura 14** - Via de sinalização compreendendo os genes analisados nesse trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

Como o gene *EGLN3* está diretamente envolvido na degradação ou estabilização de HIF-1 $\alpha$ , está intrinsecamente relacionado com a sobrevivência celular. Em condições de expressão normal e normóxia, *EGLN3* marca HIF-1 $\alpha$  para degradação via proteassomo. Quando com expressão aumentada, seu comportamento frente à hipóxia crônica é estabilizar HIF-1 $\alpha$ , conseqüentemente a célula não entra em morte celular por necrose, fato que contribui para um aumento da proliferação celular e uma possível recorrência da doença. Como podemos observar nos resultados desse trabalho, onde os pacientes que apresentaram recorrência da doença também apresentaram uma expressão aumentada do gene *EGLN3*.

Esses resultados sugerem que o aumento de expressão do gene *EGLN3* pode ser um fator prognóstico de recorrência da doença em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, exceto na região topográfica de laringe.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 58:959-65.

Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1801-10.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. **Lancet** 2008; 371:1695-709.

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

Barreto BD. **Validação de classificadores moleculares preditores de resposta à quimioterapia combinada com radioterapia em carcinoma epidermóide de laringe e hipofaringe localmente avançado**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Boyle P, Levin L. **World Cancer Report, 2008**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.

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

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

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

Chow V, Yuen AP, Lam KY, Ho WK, Wei WI. Prognostic significance of serum p53 protein and p53 antibody in patients with surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2001; 23:286-91.

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

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

Cortesina G, Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Acta Otorhinolaryngol Ital** 2006; 26:317-25.

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

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

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

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

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

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

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.

Gasparotto D, Maestro R. Molecular approaches to the staging of head and neck carcinomas (review). **Int J Oncol** 2007; 31:175-80.

Gath HJ, Brakenhoff RH. Minimal residual disease in head and neck cancer. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:109-26.

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

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

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

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

Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. **Head Neck Oncol** 2009; 1:36.

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

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

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

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

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2003; 260:502-8.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:777-89.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:225-49.

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

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

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

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

Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al. Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. **Oral Oncol** 2000; 36:474-83.



Liang X, Yang D, Hu J, Hao X, Gao J, Mao Z. Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2008; 28:1659-66.

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

Matta A, Ralhan R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Oncol** 2009; 1:6.

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.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol** 2009; 45:324-34.

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

Morgillo F, Bareschino MA, Bianco R, Tortora G, Ciardiello F. Primary and acquired resistance to anti-EGFR targeted drugs in cancer therapy. **Differentiation** 2007; 75:788-99.

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

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

O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2002; 38:627-40.

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

Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. **Oncogene** 1997; 14:1799-803.

Pentheroudakis G, Angouridakis N, Wirtz R, et al. Transcriptional activity of human epidermal growth factor receptor family and angiogenesis effectors in locoregionally recurrent head and neck squamous cell carcinoma and correlation with patient outcome. **J Oncol** 2009; 2009:854127.

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

Pilch BZ, Bouquot J, Thompson LDR. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. **Pathology and genetics of head tumours**. Lyon: IARC Press; 2005. p.15-7. (WHO Classification of Tumours, Volume 9)

Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:2871-5.

Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:3630-3.

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

Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. **Int J Radiat Biol** 2007; 83:781-91.

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

Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2005; 24:47-69.

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

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

Shang ZJ, Li ZB, Li JR. VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: in vitro and in vivo studies. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2006; 35:533-8.

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

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

Smith BD, Haffty BG, Sasaki CT. Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. **Ann Otol Rhinol Laryngol** 2001; 110:221-8.

Stolf BS, Abreu CM, Mahler-Araújo MB, 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; 227:59-73.

Thomas SM, Grandis JR. The current state of head and neck cancer gene therapy. **Hum Gene Ther** 2009; 20:1565-75.

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

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

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

van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. **J Pathol** 2002; 198:476-86.

Villaret DB, Wang T, Dillon D, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. **Laryngoscope** 2000; 110:374-81.

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

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Yu YH, Kuo HK, Chang KW. The evolving transcriptome of head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **PLoS One** 2008; 3(9):e3215.

**ANEXOS**

---

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética



Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 12 de Maio de 2008.


Ao  
Dr. Luiz Fernando Lima Reis

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 681/05 - extensão  
“Validação de marcadores moleculares associados ao comportamento biológico dos tumores de cabeça e pescoço”.

Prezado Doutor:

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 22/04/2008, **aprovaram** a realização do estudo em referência como extensão do projeto já aprovado por este comitê denominado: “Correlação entre perfil de expressão gênica em amostras de carcinoma epidermóide em diferentes localizações topográficas: Implicações para abordagens de tratamento e prognóstico”.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

## Parecer Consubstanciado

**Projeto:** 681/05 (extensão)


**Título:** “Validação de marcadores moleculares associados ao comportamento biológico de tumores de cabeça e pescoço”.

**Pesquisador Responsável:** Dr. Luiz Fernando Lima Reis

**Aluna:** Camila Morais Melo

**Análise da consulta ao comitê de ética em pesquisa:** O projeto anteriormente aprovado 681/05, contemplava as amostras que serão utilizadas no presente projeto. O estudo é igualmente retrospectivo e não serão incluídos novos casos. O objetivo do projeto original “Perfil de expressão genética em carcinoma epidermóide: alterações em módulos funcionais associados à biologia e ao comportamento desses tumores” era identificar o padrão de expressão gênica em carcinoma epidermóide em diferentes órgãos. A maioria dos casos estudados eram originados no epitélio das vias aerodigestivas superiores. Entendemos que a validação de marcadores moleculares identificados no projeto original, bem como a sua associação com o comportamento biológico daqueles tumores já estava prevista naquele projeto. Desse modo, recomendamos que o adendo apresentado seja aprovado e que o projeto tenha a continuidade, somente utilizando novos recursos humanos. Os responsáveis por este projeto são os Drs. Luiz Fernando Lima Reis e Alex Fiorini de Carvalho, ambos envolvidos no projeto originalmente apresentado.

**Parecer Final:**  
Projeto Aprovado



FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE  
Hospital do Câncer A. C. Camargo  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Préf. Dr. Luiz Paulo Kowalski  
Coordenador