



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

LUIS EDUARDO SILVA MÓZ

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DO EDEMA DE REINKE

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Pintor dos Reis
Co-orientadoras: Prof.^a Titular Silvia Regina Rogatto
Prof.^a Adjunta Regina Helena Garcia Martins

**Botucatu
2017**

Luis Eduardo Silva Móz

Caracterização genômica do Edema de Reinke

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Pintor dos Reis
Co-orientadoras: Prof.^a Titular Silvia Regina Rogatto
Prof.^a Adjunta Regina Helena Garcia Martins

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Móz, Luis Eduardo Silva.

Caracterização genômica do Edema de Reinke / Luis Eduardo Silva Móz. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Patrícia Pintor dos Reis

Coorientador: Regina Helena Garcia Martins

Coorientador: Silvia Regina Rogatto

Capes: 40102025

1. Laringe - Doenças. 2. Pregas vocais. 3. Expressão gênica. 4. Hibridização Genômica Comparativa.

Palavras-chave: Alterações genômicas; CGH array; Edema de Reinke.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos e a todos os pesquisadores que apesar de todas as adversidades, destinam o seu tempo ao desenvolvimento de trabalhos que visam responder a uma dúvida ou a encontrar uma solução para um problema, independente da área do conhecimento.

Busque diariamente chegar ao que você considera ser o seu auge, com perseverança, humildade e honestidade. E quando alcançá-lo verá que subiu apenas mais um degrau na infinita escada evolutiva que o universo nos reserva.

(Luis Eduardo Silva Móz)

Agradecimentos

A Deus, por proporcionar a vida e minha evolução.

Ao meu pai Odair Móz Munhoz, minha mãe Rosangela Silva Móz, meu irmão Cristian e minha irmã Natacha, por acreditarem nessa realização e fornecerem o apoio necessário em todos os momentos, sendo o esteio da minha vida.

Aos pacientes, que permitiram que um fragmento de tecido obtido após uma remoção cirúrgica fosse utilizado e analisado nesse trabalho.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Patrícia Pintor dos Reis, pela oportunidade oferecida para que eu alcançasse mais um objetivo em minha vida, pelo conhecimento transmitido e pela orientação ao longo do período que esse trabalho foi realizado.

À minha co-orientadora, Prof.^a Adjunta Regina Helena Garcia Martins, por ter aberto portas desde a época da minha Graduação em Medicina, tendo orientado uma iniciação científica que foi a semente para que esse trabalho fosse realizado, e pelo estímulo e apoio para que eu ingressasse na Pós-Graduação ainda no sexto ano da Graduação.

À minha co-orientadora, Prof.^a Titular Silvia Regina Rogatto, pelas contribuições desde a elaboração inicial do projeto, sobretudo, por ter permitido que as instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do Hospital A.C.Camargo, na cidade de São Paulo, fossem utilizadas para a realização de parte do projeto.

Ao Rainer Marco Lopes Lapa, pelo importante apoio na realização da parte experimental do trabalho.

Ao Rolando André Rios Villacis, pelo importante apoio na etapa de análise dos dados obtidos com a Hibridação Genômica Comparativa.

Aos amigos e familiares que reconheceram o propósito de todo meu esforço e entenderam os momentos em que tive que estar ausente e distante para que pudesse cumprir com o objetivo de conclusão desse trabalho.

À amiga Tamiris Uracs de Sales Graça, por todo o apoio fornecido durante o período de realização deste trabalho.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório NeoGene, pela colaboração em todas as etapas desse trabalho.

Aos membros da banca (Dr. Agrício Nubiato Crespo, Dra. Regina Helena Garcia Martins, Dra. Silke Anna Theresa Weber, Dra. Sandra Aparecida Drigo Linde e Dra. Graziela de Oliveira Semenzati) pelas sugestões e contribuições ao aprimoramento do trabalho.

À Faculdade de Medicina de Botucatu e ao Hospital das Clínicas, pelo apoio institucional, especialmente aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da biblioteca do campus de Botucatu.

Resumo

Introdução: o Edema de Reinke (ER) é uma lesão laríngea considerada benigna relacionada ao tabagismo. Dados em literatura relatam associações entre o ER e a detecção de diferentes graus de displasia e carcinoma *in situ*, bem como alterações na imunoeexpressão de proteínas tumorais como a p53. Alguns autores classificam o ER entre as lesões pré-malignas, com risco de transformação e progressão para carcinoma de laringe. Não havendo consenso na literatura, torna-se necessária a realização de estudos moleculares. **Objetivos:** caracterizar o perfil genômico global de alterações no número de cópias do DNA em amostras de pacientes com ER. **Métodos:** oito amostras removidas por microcirurgia foram submetidas à extração do DNA. Os perfis de alteração no número de cópias genômicas e os genes candidatos associados foram analisados pela metodologia da hibridação genômica comparativa (CGH *array*), utilizando-se a plataforma de 4x180K (*Agilent Technologies*). Os dados de microarranjos foram analisados utilizando o programa *CytoGenomics v4.0.2.21 (Agilent Technologies)*. As alterações no número de cópias (CNAs) obtidas foram comparadas com o banco de dados *Database of Genomic Variants (DGV)*. A classificação dos genes selecionados para análise foi realizada baseada em dados descritos no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. **Resultados:** Foram encontrados perdas, ganhos ou deleções em 54 genes, um RNA não codificador longo intergênico (lincRNA), seis sequências hipotéticas e 10 microRNAs, com alterações compartilhadas por pelo menos dois pacientes. Em oito genes, duas sequências hipotéticas e dois lincRNAs foram constatadas alterações raras. **Conclusão:** Este estudo inédito revela a presença de alterações genômicas no ER. Alguns genes relatados no estudo estão implicados em processos de carcinogênese, inclusive com alterações em regiões cromossômicas semelhantes às descritas em carcinomas de laringe, sinalizando a necessidade de pesquisas adicionais focadas em genes que participam das vias moleculares relacionadas ao desenvolvimento dessa lesão.

ABSTRACT

Introduction: Reinke's edema is a benign laryngeal lesion related to excessive tobacco smoking. Reinke's edema (RE) has been associated with different degrees of dysplasia and *in situ* carcinoma, as well as with TP53 protein expression changes. Some authors classify RE among premalignant lesions, considering that these lesions may be prone to malignant transformation and may eventually progress to laryngeal carcinoma, without consensus in the literature. Thus, it is necessary to carry out molecular studies.

Objectives: global genomic characterization of DNA copy number alterations (CNAs) in Reinke's edema samples. **Methods:** eight samples removed by microsurgery were submitted to DNA extraction. We performed global copy number molecular profiling analysis using the Agilent 4x180K array comparative genomic hybridization (aCGH) platform. Data analysis was performed using CytoGenomics software v4.0.2.21 (Agilent Technologies). CNAs were compared against the Database of Genomic Variants (DGV). In addition, genes mapped on regions of copy number gains or losses had their functions annotated using the National Center for Biotechnology Information (NCBI). **Results:** we were able to identify copy number alterations in fifty-four genes, one intergenic long non-coding RNA (lincRNA), six hypothetical sequences and ten microRNAs, with common alterations shared by at least two patients. In eight genes, two hypothetical sequences and two lincRNAs rare changes were noted. **Conclusions:** To our knowledge this is the first study in the literature that reveals the presence of genomic changes in RE. Some genes reported in the study are implicated in carcinogenesis processes, including changes in chromosomal regions similar to those described in laryngeal carcinomas indicating the need for additional research focused on genes that participate in molecular pathways related to the development of this lesion.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aCGH	Hibridação Genômica Comparativa Baseada em Arrays
<i>Alu I</i>	Primeira enzima de restrição isolada da <i>Arthrobacter luteus</i>
CNA	Copy Number Alteration
CNV	Copy Number Variation
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Edema de Reinke
gDNA	DNA genômico
lincRNA	RNA não codificador longo intergênico
miRNA	microRNA
min	Minuto
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	RNA não codificante
pb	Pares de bases
pmol/uL	Picomol por microlitro
RNA	Ácido ribonucleico
<i>Rsa I</i>	Primeira enzima de restrição isolada da <i>R. sphaeroides</i>
TGF-B	Fator de transformação do crescimento Beta
uL	Microlitro

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVO	3
4. MATERIAIS E MÉTODOS	3
4.1 Critérios de inclusão, critérios de exclusão e coleta das amostras	4
4.2 Extração do DNA e realização da Hibridação Genômica Comparativa por array (aCGH)	4
4.3 Análise dos dados	6
5. RESULTADOS	6
6. DISCUSSÃO	9
6.1 Alterações genômicas compartilhadas por mais de um paciente	9
6.2 Alterações genômicas consideradas raras	12
6.3 Alterações genômicas em carcinoma espinocelular de laringe	15
7. CONCLUSÃO	16
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Alterações histopatológicas no Edema de Reinke	24
Tabela 2 – Ganhos, perdas e deleções compartilhados por mais de um paciente	25
Tabela 3 – Ganhos, perdas e deleções raras	26

Lista de Fotos

Foto 1 – Pregas vocais normais (Laringoscopia indireta)	27
Foto 2 – Edema de Reinke (Laringoscopia direta)	27

Lista de Figuras

Figura 1 – Regiões em que foram encontrados os ganhos, perdas e deleções em mais de um paciente	28
Figura 2 – Alteração considerada rara: ganho em 2q37.3 (caso 4)	28
Figura 3 – Alteração considerada rara: perda em 4q13.3 (caso 7)	29
Figura 4 – Alteração considerada rara: deleção em 7q11.22 (caso 5)	29
Figura 5 – Alteração considerada rara: perda em 10p14 (caso 3)	30
Figura 6 – Alteração considerada rara: ganho em 13q34 (caso 2)	30
Figura 7 – Alteração considerada rara: ganho em 8p23.3-p11.21 (caso 7)	31
Figura 8 – Alteração considerada rara: ganho em 8q11.1-q24.3 (caso 7)	31
Figura 9 – Redes de interação proteína-proteína – CNAs comuns a mais de um paciente	32
Figura 10 – Redes de interação proteína-proteína – CNAs raras	32

1. INTRODUÇÃO

O Edema de Reinke é uma lesão laríngea crônica na qual as pregas vocais apresentam-se distendidas pelo acúmulo de muco espesso em sua lâmina própria (Fotos 1 e 2). Acomete especialmente mulheres tabagistas, as quais passam a apresentar a voz virilizada, com frequência fundamental mais grave (MARTINS, et al., 2009). As discrepâncias nos dados epidemiológicos concentram-se, provavelmente, na falta de discriminação dos pacientes em faixas etárias, conduta de extrema importância uma vez que o Edema de Reinke é uma lesão laríngea que acomete, particularmente, pacientes adultos fumantes crônicos (HAH et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MELO et al., 2001).

Embora o Edema de Reinke seja classificado entre as lesões laríngeas benignas, a sua estreita relação com o tabagismo e a constante associação com displasia nos laudos histopatológicos têm sido motivo de preocupação (MARCOTULLIO et al., 2002; PASTUSZEK et al., 2003), sendo questionado se o Edema de Reinke não deveria ser classificado entre as lesões pré-neoplásicas da laringe (MARTINS et al., 2009; MÓZ et al., 2013). (Tabela 1)

Estes achados descritos em literatura apontam a falta de consenso em relação ao caráter benigno ou maligno do Edema de Reinke, havendo a dúvida sobre quais pacientes teriam maior risco de desenvolver carcinoma de laringe. Dessa forma, são necessárias análises moleculares detalhadas que permitam caracterizar individualmente essas lesões, para o melhor entendimento do desenvolvimento do Edema de Reinke. Sob essa perspectiva, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos desde a década de 90, incluindo a análise da expressão protéica por meio de técnica de imunohistoquímica, e nos últimos anos a análise transcricional.

Em estudo prévio, nosso grupo avaliou a imunexpressão da proteína p53 em 67 amostras de edema de Reinke e em 60 carcinomas espinocelulares de laringe. Foi observada a imunexpressão positiva em 74,6% e 95% dos casos, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os grupos (MÓZ et al. 2013), corroborando a hipótese de que o Edema de Reinke pode ter um caráter maligno.

BRANSKI et al. (2009) investigaram o efeito do tabagismo sobre o metabolismo oxidativo e sobre o fenótipo dos fibroblastos das pregas vocais em amostras de Edema de Reinke quando comparado às amostras de pólipos. Os autores relataram que o

tabagismo influenciava no fenótipo e estava relacionado ao aumento da expressão do gene *HMOX-1* (heme oxigenase 1). Também foi verificado aumento *in vitro* da produção de espécies reativas de oxigênio, com diminuição na proliferação e migração de fibroblastos mediado por um mecanismo dose dependente de exposição ao tabagismo. Estes achados sugerem que a resposta antioxidativa nas pregas vocais possa ser um mecanismo de quimioproteção. Essa seria uma explicação para o fato de que o Edema de Reinke raramente sofre transformação maligna.

THIBEAULT et al. (2002), a fim de analisar a expressão gênica relacionada à matriz extracelular, avaliaram os níveis de expressão de RNA mensageiro (mRNA) em cinco amostras de pólipos vocais e quatro amostras de Edema de Reinke. Os autores verificaram que ambas as lesões apresentam aumento da expressão de procolágeno I e decorina (relacionada à neutralização do TGF-B), e diminuição da expressão das metaloproteinases MMP-1 e MMP-12. Foi observado também diminuição da expressão de fibronectina no Edema de Reinke e aumento da expressão em pólipos vocais, sendo observado o inverso com a fibromodulina.

A análise transcriptômica em amostras de pacientes com Edema de Reinke foi realizada por DUFLO et al. (2006). Os autores utilizaram uma plataforma contendo 8745 genes e relataram 65 genes diferencialmente expressos entre amostras de pólipos e de Edema de Reinke. Desses, 19 genes estavam relacionados à doença do refluxo gastroesofágico e não houve significância estatística na análise de genes para diferenciar fumantes de não fumantes. Nesse estudo, no Edema de Reinke, 25 genes estavam com expressão aumentada (*GSTA2, NDUFB5, ABCC5, DHRS9, GABRP, XIST, SIAT4C, GPX2, ARHGAP5, RELB, BMP7, SOD1, THBS2, COX6C, MAP2K3, PGD, LCN2, FLJ33915, CASP9, EXTL1, STXBP3, CCNG2, RPL7A, S100P, C20orf129*) e 40 genes estavam com expressão diminuída (*C6orf18, FLJ10871, ANXA4, COL3A1, RIS1, PRELP, INHBA, THY1, HLA-DPBI, ALOX5, PDGFRB, COL4A1, FCGR3A, FLJ38508, RAFTLIN, SPARCL1, CCL18, HLA-DRA, LTBP2, PECAM1, MCAM, IGLC2, FVT1, GPM6B, FGFR4, GFPT2, PRG1, FLJ14054, COL1A2, RFX5, COL6A3, CTSL, C10orf10, MSN, EIF1AY, SPARC, LMCD1, COL5A2, MMD, ITGB2*).

As diferenças na sequência do DNA do genoma humano são responsáveis pela nossa singularidade fenotípica. Técnicas de hibridização genômica comparativa (CGH) têm sido utilizadas para a realização de estudos genômicos em diversas doenças, incluindo as neoplasias malignas. A técnica de CGH-array permite a detecção quantitativa em alta resolução das alterações no número de cópias de regiões genômicas

específicas. Realiza-se uma reação de hibridação em uma lâmina contendo milhares de sondas após uma etapa de coibridação do DNA extraído da lesão com um DNA de referência. (ISHKANIAN et al., 2010; PARK et al., 2010). Esta estratégia permite a detecção de alterações genômicas incluindo ganhos, perdas, deleções e/ou ampliações denominadas de CNV (*Copy Number Variation*) quando germinativas e CNA (*Copy Number Alteration*) quando somáticas ou adquiridas, usando um genoma de referência para comparação dos dados. (LI et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Dados em literatura apontam para uma associação entre o Edema de Reinke e o tabagismo (um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço). Além disso, também tem sido demonstrada a presença de diferentes graus de displasia e carcinoma *in situ* em um subgrupo de pacientes, bem como alterações na imunexpressão de proteínas tumorais como a p53, a qual está significativamente alterada em uma alta proporção de tumores humanos. Em virtude dessas associações há controvérsias quanto à classificação dessa doença como benigna, uma vez que o Edema de Reinke incide basicamente em pacientes tabagistas crônicos, fator este comprovadamente carcinogênico.

3. OBJETIVO

Caracterizar o perfil genômico global de alterações no número de cópias do DNA em amostras de pacientes com Edema de Reinke.

4. Metodologia

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) sob o protocolo de número Protocolo CEP 4345-2012.

Foi realizada revisão dos artigos publicados na literatura, considerando as plataformas de dados *EMBASE*, *PUBMED*, *COCHRANE* e *LILACS*, utilizando-se uma estratégia de busca geral [*((reinke edema) or (edema reinke) or (reinke´s edema) or (reinke´s oedema) or (reinke oedema) or (polypoid corditis))*], a fim de se obter o maior número possível de artigos sobre Edema de Reinke para avaliação. A estratégia de

busca foi pesquisada nas plataformas de dados citadas nos meses de Fevereiro de 2015 e Outubro de 2016.

4.1 Critérios de inclusão, critérios de exclusão e coleta das amostras

Foram convidados a participar do estudo pacientes adultos com diagnóstico videolaringoscópico de Edema de Reinke e com indicação de microcirurgia de laringe para remoção da lesão. Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido fornecido antes da cirurgia. As amostras das lesões foram avaliadas por patologistas experientes após a cirurgia, confirmando o diagnóstico histopatológico de Edema de Reinke.

Os critérios de exclusão consistiram em pacientes com outros diagnósticos videolaringoscópicos; pacientes portadores de Edema de Reinke que apresentavam também outras doenças infecciosas crônicas sistêmicas associadas que pudessem comprometer concomitantemente as mucosas das vias aéreas; pacientes com diagnóstico prévio de neoplasia laríngea ou cujo exame histopatológico, após a microcirurgia de Edema de Reinke, confirmasse a presença de carcinoma;

Após a remoção cirúrgica da lesão, um pequeno fragmento, correspondendo a aproximadamente 0,5cm, foi imediatamente colocado em *criotubo*, transportado em nitrogênio líquido ou gelo seco e devidamente armazenado em freezer a -80°C para a correta preservação do material genético.

4.2 Extração do DNA e realização da Hibridação Genômica Comparativa por array (aCGH)

O protocolo de extração de DNA utilizado foi o do fenol/clorofórmio para tecidos congelados (BAREA et al., 2004; ISOLA et al., 1994). Após a extração realizou-se a análise de avaliação da concentração e da qualidade do DNA utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop 8000*. Após esta certificação as amostras foram estocadas a -20°C.

Os perfis de alteração no número de cópias genômicas e os genes candidatos associados foram analisados pela metodologia de CGH *array*, utilizando-se a plataforma de 4x180K (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Califórnia, EUA). Esta plataforma de oligonucleotídeos contém aproximadamente 170.000 sondas de 60pb que mapeiam genes particularmente envolvidos em câncer e outras sequências codificadoras e não-codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>), presentes no banco de dados

genômicos da Universidade da Califórnia, Santa Clara, Califórnia, EUA (UCSC hg19 - *Genome Reference Consortium* GRCh37, fev. 2009). Disponível em: <http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQreleases.html> (Acessado em 05/11/2016)

Como referência, foi usado gDNA comercial normal para o sexo masculino e feminino (*SureTag DNA Labeling Kit – Human Reference DNA Male and Female-Agilent Technologies*).

Os procedimentos de digestão, marcação e hibridação foram realizados de acordo com as instruções recomendadas pelo fornecedor (*Agilent Technologies*). As amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,2 µL de água ultra-pura estéril, 2,6 µL de tampão de reação 10X, 0,5 µL da enzima *Alu I* e 10u/µL da enzima *Rsa I* (*Promega*, Madison, WI, EUA). O produto da reação foi incubado a 37°C por 2 horas, 65°C por 15 min e mantida em gelo durante o procedimento. O tempo de digestão das amostras foi determinado após a avaliação da integridade do gDNA observada em gel de agarose 1%.

Em seguida, o DNA teste e referência foram marcados diferencialmente com *Cy3TM-dUTP* (cianina 3 trifosfato deoxiuridina) e *Cy5TM-dUTP* (cianina 5 trifosfato deoxiuridina), respectivamente, em uma reação baseada no uso de iniciadores randômicos e na atividade da enzima *Exo-Klenow* (*Agilent Technologies*). Essa reação foi realizada a 37°C por 2 horas e 65°C por 15 min. Com o intuito de remover as cianinas não incorporadas ao gDNA foi realizada a purificação das amostras, utilizando-se colunas de purificação (*Agilent Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os gDNAs marcados foram quantificados em *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* com o objetivo de calcular a eficiência da reação de marcação. A hibridação das amostras foi realizada de acordo com os valores de eficiência descritos no protocolo da *Agilent Technologies* (*Cy3TM-dUTP*: 25-40 pmol/µL; *Cy5TM-dUTP*: 20-35 pmol/µL), combinados na razão de 1:1 segundo este critério.

O procedimento de hibridação consistiu na adição de 11 µL de 10X *Blocking Agent* e 55 µL de *Hi-RPM Hybridization Buffer*. A reação foi incubada a 95°C por 3 min e 37°C por 30 min. Um volume de 100 µL de cada amostra foi aplicado à lâmina 4x180K, a qual foi acondicionada a 65°C por aproximadamente 20 horas.

A lavagem das lâminas consistiu em banhos consecutivos das soluções *Wash Buffer 1* por 5 min, *Wash Buffer 2* por 1 min, Acetonitrila por 30 segundos e solução de estabilização e secagem por 30 segundos.

4.3 Análise dos dados

Os dados de microarranjos foram analisados utilizando o programa *CytoGenomics* v4.0.2.21 (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Califórnia, EUA) com os seguintes parâmetros: algoritmo de detecção ADM-2 (*Aberration Detection Method 2*); limiar de sensibilidade (*threshold*) de 6,0; correções *Fuzzy Zero e Centralization*; e mínimo de quatro sondas consecutivas alteradas com valores de $\log_2\text{ratio} \geq 0,25$ ou $\leq -0,25$ para considerar um segmento como uma região de ganho ou perda, respectivamente. A fim de evitar falsos positivos, todos os rearranjos genômicos identificados pelo *software* foram verificados visualmente e aqueles com baixa qualidade no padrão de hibridação das sondas foram excluídos. As CNAs obtidas foram comparadas com o *Database of Genomic Variants (DGV)* - <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (atualização Maio/2016), que é um banco de dados que agrega CNVs germinativas presentes em pacientes fenotipicamente normais. As alterações também foram comparadas com o banco de dados de um grupo controle de 100 indivíduos da população brasileira (Krepischi et al., 2012). Alterações encontradas respectivamente em menos do que 0,05% e 5% dos casos presentes nos dois bancos de dados testados foram consideradas raras.

A avaliação sobre a classificação dos genes selecionados para análise e a associação com estudos da literatura foi realizada baseada em dados descritos no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Acessados nos meses de Outubro e Novembro de 2016).

As redes de interação proteína-proteína entre as proteínas codificadas por genes foram construídas utilizando-se o *Integrated Interactions Database - version 2016-03* (KOTLYAR et al., 2015). As imagens de redes foram geradas pelo *software* NAVIGaTOR (BROWN et al., 2009) (<http://ophid.utoronto.ca/navigator>), com aprimoramento das imagens com o uso do *software* Illustrator (<https://www.adobe.com/br/products/illustrator.html>).

5. Resultados

Em revisão de literatura foram encontrados 397 artigos, publicados entre os anos de 1961 e 2016, sendo que 88 artigos não estavam relacionados ao tema, estavam

duplicados dentro de uma mesma base de dados ou de modo simultâneo em mais de uma base de dados. Não foi encontrado nenhum artigo relacionado com alterações genômicas no Edema de Reinke.

Dentre os oito pacientes com amostras validadas e analisadas, quatro eram do sexo masculino (pacientes 1, 3, 6 e 8) e quatro do sexo feminino (pacientes 2, 4, 5 e 7), com idades ao diagnóstico/cirurgia entre 31 e 58 anos, com média de idade de 46,5 anos. Todos os pacientes apresentavam antecedente de tabagismo atual ou prévio, com história de pelo menos 30 anos-maço de cigarro, com exceção do paciente 1, que teve o diagnóstico aos 31 anos. O paciente 3 tinha antecedente pessoal de neoplasia maligna de bexiga e antecedente familiar de neoplasia maligna de mama (mãe) e bexiga (primo). O paciente 7 apresentava antecedente familiar neoplásico: neoplasia maligna de próstata (pai) e neoplasia maligna ginecológica (irmã). O paciente 8 apresentava um tio e um primo com neoplasias malignas, mas não soube precisar o sítio primário.

A análise histológica revelou displasia leve nas amostras dos pacientes 3 e 5 e displasia moderada na amostra do paciente 6.

As alterações genômicas compartilhadas entre dois ou mais pacientes estão apresentadas na Tabela 2 e Figura 1. As alterações genômicas raras estão apresentadas na Tabela 3 e Figuras 2-8.

As alterações compartilhadas por mais de um paciente (variando de pelo menos dois pacientes até quatro pacientes em comum) incluíram 54 genes, um RNA não codificador longo intergênico, seis sequências hipotéticas e 10 microRNAs. Foram encontradas perdas em 8p11.22 (caso 6), que compreende os pseudogenes *ADAM3A* e *ADAM5*; 8p23.1 (casos 6 e 7), que contém genes codificantes de proteínas da família das beta-defensinas (*DEFB4A*, *DEFB4B*, *DEFB103A*, *DEFB103B*, *DEFB104A*, *DEFB104B*, *DEFB105A*, *DEFB105B*, *DEFB106A*, *DEFB106B*, *DEFB107A* e *DEFB107B*), bem como os genes *PRR23D1*, *PRR23D2*, *SPAG11A* e *SPAG11B*, estes últimos codificando proteínas secretoras dependentes de androgênio; e os pseudogenes *FAM90A7P* e *FAM90A10*. Outras regiões de perda foram detectadas em 14q11.2 (casos 1, 3 e 8), uma região que contém os genes *OR4K1*, *OR4K2* e *OR4K5* que também pertencem à família dos receptores olfatórios, a família dos genes *POTE* (*POTEG* e *POTEM*), os pseudogenes *DUXAP10*, *BMS1P17*, *BMS1P18* e *BMS1P22*. Nesta região também foi mapeado o lincRNA *LINC01296*, bem como as sequências hipotéticas *LOC642426*, *LOC101929572* e *LOC100508046*. Também foram identificadas perdas em 15q11.2 (casos 2 e 5), uma região que contém os genes *OR4N4*, *OR4M2*, o

pseudogene *OR4N3P* (todos da família dos receptores olfatórios), membros da família *POTE* (*POTEB*, *POTEB2* e *POTEB3*), *CXADRP2*, *REREP3*, membros da família *GOLGA* (o pseudogene *GOLGA8DP* e os genes *GOLGA6L1* e *GOLGA6L2*), *LOC646214*, o pseudogene *NFIP2* e as sequências hipotéticas ou não caracterizadas *LOC101927079* e *LOC727924*. Alguns microRNAs (miRNAs) foram mapeados em 15q11.2, incluindo o miR-3118-2, miR-3118-3, miR-3118-4, miR-4509-1, miR-4509-2, miR-4509-3, miR-5701-1, miR-5701-2, miR-5701-3 e miR-1268a. Foram encontradas deleções em 1q44 (caso 6), incluindo os genes *OR2T3*, *OR2T10*, *OR2T34* e o pseudogene *OR2T11*; 3q26.1 (casos 1 e 3), sem genes mapeados; 11q11 (caso 1), que contém o gene *OR4C6*, relacionado aos receptores olfatórios.

Ganhos genômicos identificados em regiões contendo genes conhecidos foram mapeados em 1q44 (caso 2), incluindo os genes *OR2T3*, *OR2T10*, *OR2T34* e o pseudogene *OR2T11*; 11q11 (casos 2, 3, 6 e 8), que inclui os genes *OR4P4*, *OR4S2* e *OR4C6*, e em 14q11.2 (caso 7), incluindo os genes *OR4K1*, *OR4K2* e *OR4K5* (todos eles pertencentes à família dos receptores olfatórios). Ganhos também foram identificados em 8p11.22 (casos 2, 5 e 7), incluindo os pseudogenes *ADAM3A* e *ADAM5*; e nas regiões 12p13.31 (casos 1 e 3) e 14q11.2 (casos 6 e 8), porém sem genes mapeados.

Alterações no número de cópias consideradas raras foram detectadas em regiões contendo oito genes, duas sequências hipotéticas e dois lincRNAs. Foram identificadas deleções em 4q13.1 (caso 1) e em 7q11.22 (caso 5), região que contém o gene *AUTS2* (cobrindo apenas região intrônica do gene). Perdas raras foram identificadas em 4q13.3 (caso 7), que inclui os genes *CABS1*, *SMR3A*, *SMR3B* e *PROL1* (cobrindo todos os genes por completo) e em 10p14 (caso 3), uma região que contém dois lincRNAs (*LINC00706* e *LINC00707*) e a sequência hipotética *LOC101928150* (cobrindo todo o *LINC00706*, dois éxons do *LINC00707* e 1 éxon do *LOC101928150*).

Ganhos raros foram mapeados em 2q37.3 (caso 4), que compreende a sequência hipotética *LOC93463* e os genes *COPS8* e *COL6A3* (cobrindo todo o *COPS8* e *LOC93463*, além de vários éxons do *COL6A3*); 13q34 (caso 2), região na qual o gene *RASA3* é mapeado (com cobertura de vários éxons do gene); e ganhos cobrindo todo o braço curto e longo do cromossomo 8 (8p23.3-p11.21 e 8q11.1-q24.3) (caso 7).

As Figuras 9 e 10 mostram as redes de interação proteína-proteína entre as proteínas codificadas por genes. Estes genes estão localizados em regiões cromossômicas nas quais foram encontradas alterações comuns a mais de um paciente e

alterações consideradas raras. Algumas interações demonstradas são validadas na literatura por modelos experimentais e outras por algoritmos matemáticos.

6. Discussão

6.1 Alterações genômicas compartilhadas por mais de um paciente

Entre as alterações que foram comuns a mais de um paciente, está incluído o ganho em 1q44 no paciente 2 e a deleção de 1q44 no paciente 6, com os genes codificantes correspondentes *OR2T10*, *OR2T34*, *OR2T3* e o pseudogene *OR2T11*, pertencentes à família dos receptores olfatórios. Pseudogenes consistem em sequências de genes que perderam a sua função durante a evolução do genoma humano. Entretanto podem apresentar funções regulatórias dos seus genes parentais (POLISENO et al., 2010). A presença de perdas e ganhos da mesma região genômica em genes da família dos receptores olfatórios podem não ter papel no desenvolvimento ou progressão da doença.

Dois casos (1 e 3) apresentaram deleção em 3q26.1. Entretanto, esta região não tem genes mapeados conhecidos até o momento.

Ganhos genômicos em 8p11.22 foram verificados nos pacientes 2, 5 e 7 e a perda da mesma região foi observada no paciente 6. Nesta região estão mapeados os pseudogenes *ADAM3A* e *ADAM5*. A deleção do gene *ADAM5* foi recentemente associada à presença de malformações crânio faciais como fissura labial, fissura palatina ou fissura lábio palatina (YOUNKIN et al., 2015). Em adição, o ganho em 8p11.22 e a consequente expressão aumentada do gene *ADAM3A* foram associados com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular conjuntival (ASNAGHI et al., 2014). Estudos funcionais futuros poderão revelar se os pseudogenes *ADAM3A* e *ADAM5* também exercem papel na constituição de alterações fenotípicas no Edema de Reinke ou se possuem papel na progressão da doença.

Os genes codificadores de defensinas do tipo Beta, importantes na resposta do sistema imune inato, como o *DEFB4A*, *DEFB4B*, *DEFB103A*, *DEFB103B*, *DEFB104A*, *DEFB104B*, *DEFB105A*, *DEFB105B*, *DEFB106A*, *DEFB106B*, *DEFB107A* e *DEFB107B*, estão mapeados na região de perda em 8p23.1 detectada nos pacientes 6 e

7. Esses genes codificam pequenas moléculas de peptídeos citotóxicos e microbicidas produzidos por neutrófilos, muito semelhantes na sequência protéica, localmente regulados pela atividade inflamatória (MACHADO; OTTOLINI, 2015).

BALS et al. (1998) isolaram e caracterizaram a Beta defensina 2, relacionando essa proteína com atividade antimicrobiana semelhante à lisozima e lactoferrina e o papel de relevância na imunidade inata. HUSE et al. (2008) relataram que as defensinas como a DEFB4 e DEFB104 possuem papel na carcinogênese prostática, associando alterações do número de cópias e variantes moleculares como potenciais marcadores tumorais. Adicionalmente, SEMLALI et al.(2015) relataram que a análise global do genoma gerou evidências da ligação de muitas doenças com a região 8p23, onde estão localizados genes relacionados às defensinas, demonstrando assim uma relação entre a desregulação da imunidade inata e o desenvolvimento de câncer de cólon.

As Beta defensinas também têm sido associadas ao desenvolvimento da espondilite anquilosante, granulomatose de Wegener, acne, sepse neonatal, enterocolite necrotizante, rinite, glaucoma primário de ângulo aberto, vasculites, dermatite atópica, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença de Crohn, colite ulcerativa. Dentre as doenças neoplásicas malignas, há relatos de estudos que avaliaram o papel das B-defensinas no desenvolvimento e progressão tumoral em câncer de esôfago, colo de útero, pulmão, melanoma, cólon e carcinoma espinocelular da cavidade oral, sendo um grupo de genes importante a ser considerado em estudos moleculares futuros em amostras de Edema de Reinke, pela sua estreita relação com o processo de carcinogênese.

A região 8p23.1 também tem mapeados os genes *PRR23D1*, *PRR23D2* e os pseudogenes *FAM90A7P* e *FAM90A10* (sem dados relevantes na literatura), bem como os genes *SPAG11A* e *SPAG11B* que codificam proteínas secretoras epididimais, dependentes de androgênios. A função específica dessas proteínas não está determinada, mas acredita-se na relação com a maturação do esperma. Algumas isoformas possuem regiões semelhantes às beta-defensinas.

Ganho em 11q11 foi observado nos pacientes 2, 3, 6 e 8 e deleção no paciente 1. Nesta região estão mapeados os genes *OR4P4*, *OR4S2* e *OR4C*, também pertencentes à família dos receptores olfatórios.

Os pacientes 1 e 3 apresentaram ganhos na região 12p13.31. Nesta região não estão mapeados genes conhecidos.

Perda genômica em 14q11.2 foi encontrada nos pacientes 1, 3 e 8 e ganho no paciente 7. Os genes *OR4K1*, *OR4K2* e *OR4K5*, também pertencentes à família dos receptores olfatórios, encontram-se mapeados nesta região. A perda na região 14q11.2 envolve o *LINC01296*, que é um RNA não codificador longo intergênico (lincRNA). Os lincRNAs apresentam um papel importante na regulação do genoma humano em processos de desenvolvimento e diferenciação celular (FATICA; BOZZONI, 2014). QIU, YAN (2015) associaram a expressão aumentada do *LINC01296* a um aumento na sobrevida global de pacientes com câncer colorretal, sugerindo seu papel como um novo biomarcador de prognóstico para esses pacientes. Temos também nessa região 14q11.2 mapeados os genes da família *POTE* (*POTEG* e *POTEM*). Na literatura descreve-se que a família de genes *POTE* contém domínios anquirina e espectrina e são expressos na próstata, testículo, ovário e placenta, inferindo um possível papel na função de sinalização no sistema reprodutivo (BERA et al., 2002; BERA et al., 2004). Em humanos, 10 variantes altamente homólogas estão distribuídas entre oito cromossomos, sendo este gene um possível alvo de imunoterapia no tratamento no câncer de próstata. Nessa região ainda estão mapeados os pseudogenes *DUXAPI0* (codifica proteínas ligantes de DNA, muitas das quais se acredita estarem relacionadas ao desenvolvimento embrionário) e *BMS1P17*, *BMS1P18* e *BMS1P22* (sem dados relevantes em literatura), bem como o gene *POTEH-AS1* e sequências hipotéticas ou não caracterizadas (*LOC642426*, *LOC101929572*, *LOC100508046*), pertencentes ao grupo dos ncRNA (RNA não codificantes). Os dados em literatura sobre esses genes ou sequências são muito limitados e outros estudos são necessários para desvendar seu papel em processos anormais de proliferação celular.

Ganhos em 14q11.2 foram identificados nos pacientes 6 e 8, mas em sequência de nucleotídeos diferente do descrito acima (*start* 22.489.904 e *stop* 22.976.316) e não contém genes conhecidos.

A perda em 15q11.2 (pacientes 2 e 5) tem mapeados os genes *OR4N4*, *OR4M2* e o pseudogene *OR4N3P* (também da família dos receptores olfatórios) e genes da família *POTE* (*POTEB*, *POTEB2* e *POTEB3*). Nessa região também estão relacionados os genes *CXADRP2* e *REREP3*, genes da família *GOLGA* (o pseudogene *GOLGA8DP* e os genes codificantes *GOLGA6L1* e *GOLGA6L22*), os pseudogenes *LOC646214* e *NF1P2*, e as sequências hipotéticas ou não caracterizadas *LOC101927079* e *LOC727924* (pertencentes ao grupo dos RNA não codificantes). Estes genes e sequências têm limitadas informações em literatura.

Adicionalmente, em 15q11.2 estão mapeados vários microRNAs. miRNAs consistem em RNAs pequenos, de aproximadamente 18-22 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas e que apresentam um importante papel na regulação gênica. Considera-se que os miRNAs estão envolvidos na grande maioria, senão, em todos os processos biológicos de desenvolvimento normal e em doenças humanas (HA; KIM, 2014). Alterações genômicas envolvendo os miRNAs *miR-3118-2*, *miR-3118-3*, *miR-3118-4*, *miR-4509-1*, *miR-4509-2*, *miR-4509-3*, *miR-5701-1*, *miR-5701-2*, *miR-5701-3* e *miR-1268A* foram identificadas em nosso estudo. Entretanto, esta plataforma não é ideal para avaliar alterações em miRNAs considerando que há um número limitado de sondas para cada um deles.

A Figura 9 mostra as redes de interação proteína-proteína entre as proteínas codificadas por genes em que foram encontradas alterações comuns a mais de um paciente. Alterações na expressão dessas proteínas identificadas são relatadas na literatura em diversos tipos de doenças benignas e neoplasias malignas, inclusive de cabeça e pescoço. Não foram encontrados artigos na literatura relacionando o papel dessas proteínas com o desenvolvimento de ER. Em relação ao carcinoma de laringe, CHEN et al. (2010) e CHEN, B. et al. (2013) relataram que o aumento da expressão de CCR6, uma proteína relacionada à resposta imunológica e apresentação de antígenos para a célula T, tem um possível papel no desenvolvimento neoplásico.

6.2 Alterações genômicas consideradas raras

O paciente 1 apresentou deleção em 4q13.1. Nesta região não há genes conhecidos.

Foi constatada perda em 10p14 (paciente 3), onde se mapeia a sequência hipotética ou não caracterizada *LOC101928150* e os lincRNAs *LINC00706* e *LINC00707*, pertencentes a classe de RNA não codificador longo intergênico. Não há dados concretos em literaturas sobre os seus papéis.

Ganho em 2q37.3 foi detectado no paciente 4. Nesta região está mapeada a sequência não caracterizada *LOC93463* e os genes *COPS8* e *COL6A3*. O gene *COPS8* codifica uma proteína que é uma das oito subunidades do signalosome *COP9* (*highly conserved protein complex*), a qual funciona como um importante regulador em múltiplas vias de sinalização. CRONE et al. (2012), estudando células de tumores gástricos identificaram o gene *COPS8* como um novo alvo para o miR-146A, o qual

está relacionado com a modulação de sinais inflamatórios, estando com expressão aumentada na maioria dos tumores gástricos. O gene *COL6A3* codifica a cadeia alfa 3, uma das três cadeias do colágeno tipo VI, encontrado na maioria dos tecidos conectivos. Foi demonstrada ligação dessas cadeias com componentes da matriz extracelular, o que explica a importância do colágeno na organização dos componentes dessa matriz (FITZGERALD et al., 2013). Mutações desse gene têm sido associadas à miopatia de Bethlem, uma rara miopatia autossômica dominante, de início precoce na infância (CAO et al., 2014) e distrofia muscular congênita de Ullrich, de caráter autossômico recessivo, mais severa que a anterior (DEMIR et al., 2002). QIAO et al. (2015), avaliando proteínas secretadas por culturas de fibroblastos colônicos e pela linhagem celular de câncer de cólon, verificaram que o aumento do transcrito *COL6A3* e da expressão da proteína no estroma das células do câncer colorretal estavam associados com pior prognóstico, sendo considerado um importante marcador para diagnóstico e prognóstico. MCCULLOCH et al. (2015) concluíram que a fibrose do tecido adiposo contribui para disfunção metabólica, estando o gene *COL6A3* com expressão diminuída em indivíduos obesos e com expressão aumentada naqueles com perda de peso por dieta ou induzida por cirurgia, havendo também regulação direta pela leptina. O aumento da expressão de *COL6A3* em adipócitos também foi associado à resistência insulínica (DANKEL et al., 2014). MOLLER et al. (2008) relataram o papel da translocação t(1;2)(p13;q37) envolvendo o gene *COL6A3* e o surgimento de tumores tenosinoviais de células gigantes, lesões benignas das bainhas dos tendões que afetam principalmente os dedos, tornozelos e pés. MAEKAWA et al. (2013) relataram o aumento da expressão de *COL6A3* em leiomiomas uterinos.

Deleção em 7q11.22, onde se mapeia o gene *AUTS2*, foi observada no paciente 5. Esse gene foi relacionado ao desenvolvimento neurológico e associado à diversas alterações neurológicas, incluindo autismo, incapacidades intelectuais e atrasos no desenvolvimento (BEUNDERS et al., 2013; FAN et al., 2016; NAGAMANI et al., 2013; OKSENBERG e AHITUV, 2013) . Também há associação em literatura com leucemia linfoblástica aguda (DENK et al., 2012), envelhecimento da pele, alopecia androgênica de início precoce e certas neoplasias malignas, além de favorecer a susceptibilidade para o consumo de álcool, dependência de heroína (CHEN, Y.H. et al., 2013; DANG et al., 2014) e desenvolvimento de esquizofrenia (ZHANG et al., 2014). HAN et al. (2015) descreveram que o gene *AUTS2* apresenta expressão aumentada em metástases hepáticas de pacientes com câncer pancreático, podendo ser considerado um

biomarcador para terapia alvo. A expressão alterada deste gene foi relacionada à resistência ao quimioterápico Docetaxel, ativação da via do TGF- β (fator de transformação de crescimento Beta), estando também relacionada às vias de sinalização *HEDGEHOG* e *WNT*.

Ganho em 13q34, onde se mapeia o gene *RASA3*, foi detectado no paciente 2. Este gene codifica uma proteína que se liga ao inositol 1,3,4,5 *tetrakisphosphate* e estimula a atividade da GTPase do RAS p21, funcionando como uma regulação negativa da via de sinalização do Ras. O produto deste gene atua na megacariocitopoiese, na adesão e migração megacariocítica, bem como sinalização de integrinas. (SCHURMANS et al., 2015).

A perda em 4q13.3, presente no paciente 7, compreende os genes *CABS1*, *SMR3A*, *SMR3B* e *PROL1*. O gene *CABS1* (*calcium binding protein, spermatid associated 1*) é um gene codificante, sem função conhecida. Os genes *SMR3A* e *SMR3B* são genes codificantes de proteínas homólogas à opiorfina. THIERAUF et al. (2016), analisando 86 casos de carcinoma adenoide cístico, constataram a diminuição da expressão de *SMR3A*, sendo o produto deste gene também um importante marcador na diferenciação histológica tumoral. O gene *PROL1* ou *OPRPN* é um gene codificante de proteínas com múltiplas funções como alívio da dor, ereção e proteção da superfície ocular. A opiorfina inibe a neprilisina e aminopeptidase N, que são peptidases que inativam a encefalina, reduzindo assim a sensibilidade à dor relacionada ao efeito da encefalina na ativação das vias opióide dependentes (THANAWALA et al., 2008). A opiorfina pode também atuar como antidepressivo. BOSLER et al. (2014), em estudo piloto, sugeriram que a opiorfina promove motilidade do esperma, pela ação de inibição sobre peptidases como a aminopeptidase N, encontradas no plasma do esperma.

Ganhos de todo o cromossomo 8 foram detectados no paciente 7. Ganhos do cromossomo 8 são relatados em processos tumorais humanos, incluindo alguns tipos de câncer, como o de mama e de próstata (RUMMUKAINEN et al., 2001; SATO et al., 2006).

A Figura 10 mostra as redes de interação proteína-proteína entre as proteínas codificadas por genes em que foram encontradas alterações raras. Alterações na expressão dessas proteínas identificadas são relatadas na literatura em diversos tipos de doenças benignas e neoplasias malignas, inclusive de cabeça e pescoço. Não foram encontrados artigos na literatura relacionando o papel dessas proteínas com o desenvolvimento de ER. Em relação ao carcinoma de laringe, CHEN et al. (2010)

relataram que a diminuição da expressão de YWHAE, uma proteína relacionada à apoptose, divisão e proliferação celular, está relacionada ao processo de desenvolvimento dessa neoplasia. WANG e GONG (2010) concluíram que a proteína CSNK2A1 desempenha um papel importante no desenvolvimento do carcinoma de laringe, sendo um possível alvo para terapias dirigidas.

6.3 Alterações genômicas em carcinoma espinocelular de laringe

Foi realizada uma análise comparativa com oito artigos publicados em literatura, que descrevem alterações genômicas (número de cópias de sequências de DNA) em carcinoma de células escamosas de laringe (AMBROSIO et al., 2013; BERGAMO et al., 2005; ECSEDI et al., 2012; GIEFING et al., 2011; JARMUZ-SZYMCZAK et al., 2013; KESER et al., 2008; KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ et al., 2010; YANG et al., 2011). Em dois estudos foram encontradas alterações em regiões cromossômicas também detectadas nos casos deste estudo. AMBROSIO et al. (2013), avaliando 32 amostras de carcinoma de laringe, relataram ganhos em 2q37 [detectamos ganhos em 2q37.3 nos pacientes 4 (*start* 237.826.846 e *stop* 238.245.191) e perda no paciente 6 (*start* 242.865.920 e *stop* 243.028.452)] e perda em 12p13 (verificamos ganho em 12p13.31 nos pacientes 1 e 3). Displasia leve foi detectada no paciente 3 e displasia moderada no paciente 6. Estes dados indicam que estas alterações podem ter relevância como marcadores preditivos de progressão no Edema de Reinke.

ECSEDI et al. (2012), analisando um caso raro de subtipo basalóide de carcinoma espinocelular de laringe, mais agressivo e de pior prognóstico, relataram perda em 4q12-q23 (constatamos deleção em 4q13.1 no paciente 1 e perda genômica em 4q13.3 no paciente 7); perda em 8p11.22 e ganho em 8p11.22 (os pacientes 2, 5 e 7 também apresentaram ganhos desta região e o paciente 6 perda genômica nessa região); perda em 15p11.1-q11.2 (perda em 15q11.2 foi encontrada nos pacientes 2 e 5). Displasia leve foi detectada no paciente 5 e displasia moderada no paciente 6. Estes achados podem apontar alterações associadas com proliferação celular anormal, incluindo genes associados com risco aumentado de progressão para carcinomas de laringe.

7. Conclusão

Este estudo inédito revela a presença de alterações genômicas no ER. Alguns genes relatados no estudo estão implicados em processos de carcinogênese, inclusive com alterações em regiões cromossômicas semelhantes às descritas em carcinomas de laringe, sinalizando a necessidade de pesquisas adicionais focadas em genes que participam das vias moleculares relacionadas ao desenvolvimento dessa lesão.

Referências

AMBROSIO, E.P., SILVEIRA, C.G., DRIGO, S.A., SACOMANO, V de S., MOLCK, M.C., ROCHA, R.M., DOMINGUES, M.A., SOARES, F.A., KOWALSKI, L.P., ROGATTO, S.R. Chromosomal imbalances exclusively detected in invasive front area are associated with poor outcome in laryngeal carcinomas from different anatomical sites. *Tumour Biol*, v. 34, n.5, p. 3015-26, out. 2013.

ASNAGHI, L., ALKATAN, H., MAHALE, A., OTHMAN, M., ALWADANI, S., AL-HUSSAIN, H., JASTANEIAH, S., YU, W., MAKTABI, A., EDWARD, D.P., EBERHART, C.G.. Identification of multiple DNA copy number alterations including frequent 8p11.22 amplification in conjunctival squamous cell carcinoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 55, n.12, p.8604-13, dez.2014.

BAREA, J.A., PARDINI, M.I.M.C, GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v.26, n.4, p. 274-281, 2004.

BALS, R., WANG, X., WU, Z., FREEMAN, T., BAFNA, V., ZASLOFF, M., WILSON, J.M. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*, v.102, n.5, p.874-80, set.1998.

BERA, T.K., ZIMONJIC, D.B., POPESCU, N.C., SATHYANARAYANA, B.K., KUMAR, V., LEE, B., PASTAN, I. POTE, a highly homologous gene family located on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.26, p.16975-80, dez.2002.

BERA, T.K., HUYNH, N., MAEDA, H., SATHYANARAYANA, B.K., LEE, B., PASTAN, I. Five POTE paralogs and their splice variants are expressed in human prostate and encode proteins of different lengths. *Gene*, v.337, p.45-53, ago.2004.

BÉRGAMO, N.A., VEIGA, L.C.S., REIS, P.P., NISHIMOTO, I.N., MAGRIN, J., KOWALSKI, L.P., SQUIRE, J.A., ROGATTO, S.R. Classic and Molecular Cytogenetic Analyses Reveal Chromosomal Gains and Losses Correlated with Survival in Head and Neck Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, v.11, n.2, jan.2005.

BEUNDERS, G., VOORHOEVE, E., GOLZIO, C., *et al.* Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet*, v. 92, n.2, p.210-20, fev.2013.

BOSLER, J.S., DAVIES, K.P., NEAL-PERRY, G.S. Peptides in seminal fluid and their role in infertility: a potential role for opiorphin inhibition of neutral endopeptidase activity as a clinically relevant modulator of sperm motility: a review. *Reprod Sci*, v. 21, n.11, p.1334-40, nov.2014.

BRANSKI, R.C., SALTMAN, B., SULICA, L., SZETO, H., DUFLO, S., FELSEN, D., KRAUS, D.H. Cigarette smoke and reactive oxygen species metabolism: implications for the pathophysiology of Reinke's edema. *Laryngoscope*, v. 119, p.2014-2018, 2009.

BROWN, K.R., OTASEK, D., ALI, M., McGUFFI, M.J., XIE, W., DEVANI, B., TOCH, I.L.V., JURISICA, I. NAViGaTOR: Network Analysis, Visualization and Graphing Toronto. *Bioinformatics*, v.25, n.24, p.3327-3329, dez.2009.

CAO, W., ZHANG, Y., ZHONG, C., LU, G., TAN, Y. Study of a Bethlem myopathy pedigree resulted from a novel mutation of COL6A3 gene. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, v. 31, n. 6, p.698-702, dez.2014.

CHE, X.H., CHEN, H., XU, Z.M., SHANG, C., SUN, K.L., FU, W.N. 14-3-3epsilon contributes to tumour suppression in laryngeal carcinoma by affecting apoptosis and invasion. *BMC cancer*, v. 10, p. 306, jun. 2010

CHEN, B., LU, L., TAO, L., ZHOU, L., LI, S., ZHU, L. Expression of CCR6 and CCR7 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, v. 24, n. 21, p. 975-9, nov. 2010.

CHEN, B., ZHANG, D., ZHOU, J., LI, Q., ZHOU, L., LI, S.M., ZHU, L., CHOU, K.Y., ZHOU, L., TAO, L., LU, L.M. High CCR6/CCR7 expression and Foxp3+ Treg cell number are positively related to the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, v. 30, n. 3, p. 1380-90, sep. 2013.

CHEN, Y.H., LIAO, D.L., LAI, C.H., CHEN, C.H. Genetic analysis of AUTS2 as a susceptibility gene of heroin dependence. *Drug Alcohol Depend*, v. 128, n.3, p.238-42, mar.2013.

CRONE, S.G., JACOBSEN, A., FEDERSPIEL, B., BARDRAM, L., KROGH, A., LUND, A.H., FRIIS-HANSEN, L. microRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- κ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer. *Mol Cancer*, v.11, n71, set.2012.

DANG, W., ZHANG, Q., ZHU, Y.S., LU, X.Y. The evidence for the contribution of the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in heroin dependence susceptibility. *J Mol Neurosci*, v. 54, n. 4, p.811-9, dez.2014.

DANKEL, S.N., SVÄRD, J., MATTHÄ, S., CLAUSSNITZER, M., KLÖTING, N., GLUNK, V., FANDALYUK, Z., GRYTTE, E., SOLSVIK, M.H., NIELSEN, H.J., BUSCH, C., HAUNER, H., BLÜHER, M., SKURK, T., SAGEN, J.V., MELLGREN, G. COL6A3 expression in adipocytes associates with insulin resistance and depends on PPAR γ and adipocyte size. *Obesity (Silver Spring)*, v. 22, n. 8, p.1807-13, aug.2014.

DEMIR, E., SABATELLI, P., ALLAMAND, V., FERREIRO, A., MOGHADASZADEH, B., MAKRELOUF, M., TOPALOGLU, H., ECHENNE, B., MERLINI, L., GUICHENEY, P. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, v. 70, n.6, p.1446-58, jun.2002.

DENK, D., NEBRAL, K., BRADTKE, J., PASS, G., MÖRICKE, A., ATTARBASCHI, A., STREHL, S. PAX5-AUTS2: a recurrent fusion gene in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, v. 36, n.8, p.e178-81, aug.2012.

DUFLO, S.M., THIBEAULT, S.L., LI, W., SMITH, M.E., SCHADE, G., HESS, M.M. Differential gene expression profiling of vocal fold polyps and Reinke's edema by complementary DNA microarray. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v. 115, n.9, p.703-14, set.2006.

ECSEDI, S., TÓTH, L., BALÁZS, M. Array CGH analysis of the rare laryngeal basaloid squamous cell carcinoma - a case report. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 5, n. 8, p. 834-839, out. 2012.

FAN, Y., QIU, W., WANG, L., GU, X., YU, Y.. Exonic deletions of AUTS2 in Chinese patients with developmental delay and intellectual disability. *Am J Med Genet A*, v. 170A, n.2, p.515-22, fev.2016.

FATICA, A., BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n.1, p. 7–21, jan.2014.

FITZGERALD, J., HOLDEN, P., HANSEN, U. The expanded collagen VI family: new chains and new questions. *Connect Tissue Res*, v.54, n.6, p.345-50, 2013.

GIEFING, M., ZEMKE, N., BRAUZE, D., KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M., LUCZAK, M., SZAUMKESSEL, M., PELINSKA, K., KIWERSKA, K., TÖNNIES, H., GRENMAN, R., FIGLEROWICZ, M., SIEBERT, R., SZYFTER, K., JARMUZ, M. High resolution ArrayCGH and expression profiling identifies PTPRD and PCDH17/PCH68 as tumor suppressor gene candidates in laryngeal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 50, n.3, p.154-166, mar. 2011.

HA, M., KIM, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.15, n.8, p. 509-24, ago.2014

HAH, J.H., SIM, S., AN, S.Y., SUNG, M.W., CHOI, H.G. Evaluation of the prevalence of and factors associated with laryngeal diseases among the general population. *Laryngoscope*, v. 125, n.11, p.2536-42, nov. 2015.

HAN Y, RU GQ, MOU X, WANG HJ, MA Y, HE XL, YAN Z, HUANG D. AUTS2 is a potential therapeutic target for pancreatic cancer patients with liver metastases. *Med Hypotheses*, v.85, n.2, p.203-206, aug.2015.

HUSE, K., TAUDIEN, S., GROTH, M., ROSENSTIEL, P., SZAFRANSKI, K., HILLER, M., HAMPE, J., JUNKER, K., SCHUBERT, J., SCHREIBER, S., BIRKENMEIER, G., KRAWCZAK, M., PLATZER, M. Genetic variants of the copy number polymorphic beta-defensin locus are associated with sporadic prostate cancer. *Tumour Biol*, v.29, n.2, p.83-92, 2008.

ISHKANIAN, A.S., ZAFARANA, G., THOMS, J., BRISTOW, R.G. Array CGH as a potential predictor of radiocurability in intermediate risk prostate cancer. *Acta Oncol*, v. 49, n.7, p. 888-94, out.2010.

ISOLA, J., DEVRIES,S., CHU,L., GHAZVINI,S., WALDMAN, F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in

archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*, v.145, n.6, p.1301–1308, dez.1994.

JARMUZ-SZYMCZAK, M., PELINSKA, K., KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M., BEMBNISTA, E., GIEFING, M., BRAUZE, D., SZAUMKESSEL, M., MARSZALEK, A., JANISZEWSKA, J., KIWERSKA, K., BARTOCHOWSKA, A., GRENMAN, R., SZYFTER, W., SZYFTER, K. Heterogeneity of 11q13 region rearrangements in laryngeal squamous cell carcinoma analyzed by microarray platforms and fluorescence in situ hybridization. *Mol Biol Rep*, v. 40, n.7, p.4161-71, jul.2013.

KESER, I., TORAMAN, A.D., OZBILIM, G., GUNNEY, K. LULECI, G. DNA Gains and Losses of Chromosome in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Using Comparative Genomic Hybridization. *Yonsei Med J.*, v.49, n.6, p. 949-954, dec. 2008.

KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M., GIEFING, M., JARMUS, M., BRAUZE, D., PELINSKA, K., GRENMAN, R., BARTOCHOWSKA, A., SZYFTER, W., SZYFTER, K. Recurrent amplification in the 22q11 region in laryngeal squamous cell carcinoma results in overexpression of the CRKL but not the MAPK1 oncogene. *Cancer Biomark*, v. 8, n.1, p.11-19, 2010-2011.

KOTLYAR, M., PASTRELLO, C., SHEAHAN, N., JURISICA, I. Integrated interactions database: tissue-specific view of the human and model organism interactomes. *Nucleic Acids Res*, v.4, n44, jan.2016.

KREPISCHI, A.C., ACHATZ, M.I., SANTOS, E.M., COSTA, S.S., LISBOA, B.C., BRENTANI, H., SANTOS, T.M., GONÇALVES, A., NÓBREGA, A.F., PEARSON, P.L., VIANNA-MORGANTE, A.M., CARRARO, D.M., BRENTANI, R.R., ROSENBERG, C. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res*, v. 14, n.1, fev.2012.

LI, W., LEE, A., GREGERSEN, P.K. Copy-number-variation and copy-number-alteration region detection by cumulative plots. *BMC bioinformatics*, v.10, Suppl 1:S67, 2009.

LIM, S., SAU, P., COOPER, L., MCPHADEN, A., MACKENZIE, K. The incidence of premalignant and malignant disease in Reinke's edema. *Otolaryngol Head Neck Surg*, v.150, n.3, p.434-6, mar.2014.

MACHADO, L.R., OTTOLINI, B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Front Immunol*, v.6, n.115, mar.2015.

MAEKAWA, R., SATO, S., YAMAGATA, Y., ASADA, H., TAMURA, I., LEE, L., OKADA, M., TAMURA, H., TAKAKI, E., NAKAI, A., SUGINO, N. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One*, v. 8, n.6, e66632, jun.2013.

MARCOTULLIO, D., MAGLIULO, G., PEZONE, T. Reinke's edema and risk factors: clinical and histopathologic aspects. *Am. J. Otolaryngol*, v. 23, p. 81-84, 2002.

MARTINS, R.H., FABRO, A.T., DOMINGUES, M.A., CHI, A.P., GREGORIO, E.A. Is Reinke's edema a precancerous lesion? Histological and electron microscopic aspects. *J. Voice*, v. 23, p.721-725, 2009.

MARTINS, R.H., DO AMARAL, H.A., TAVARES, E.L., MARTINS, M.G., GONÇALVES, T.M., DIAS, N.H. Voice Disorders: Etiology and Diagnosis. *J Voice*, nov.2015.

MCCULLOCH, L.J., RAWLING, T.J., SJÖHOLM, K., FRANCK, N., DANKEL, S.N., PRICE, E.J., KNIGHT, B., LIVERSEGE, N.H., MELLGREN, G., NYSTROM, F., CARLSSON, L.M., KOS, K. COL6A3 is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity. *Endocrinology*, v. 156, n. 1, p.134-46, jan.2015.

MELO, E.C.M., BRITO, L.L., BRASIL, O.C.O., BEHLAU, M., MELO, D.M. Incidência de lesões laríngeas não neoplásicas em pacientes com queixas vocais. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*, v.67, n.6, nov. 2001.

MÖLLER, E., MANDAHL, N., MERTENS, F., PANAGOPOULOS, I. Molecular identification of COL6A3-CSF1 fusion transcripts in tenosynovial giant cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 47, n.1, p.21-5, jan.2008.

MÓZ, L.E., DOMINGUES, M.A., CASTILHO, E.C., BRANCO, A., MARTINS, R.H. Comparative study of the behavior of p53 immunoeexpression in smoking associated lesions: Reinke's edema and laryngeal carcinoma. *Inhal. Toxicol*, v.25, p.17-20, 2013.

NAGAMANI, S.C., EREZ, A., BEN-ZEEV, B., FRYDMAN, M., WINTER, S., ZELLER, R., EL-KHECHEN, D., ESCOBAR, L., STANKIEWICZ, P., PATEL, A., CHEUNG, S.W. Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*, v. 21, n.3, p.343-6, mar.2013.

OKSENBERG, N., AHITUV, N. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends Genet*, v. 29, n.10, p.600-8, oct.2013.

PARK, H., KIM, J.I., JU, Y.S., GOKCUMEN, O., MILLS, R.E., KIM, S., et al. Discovery of common Asian copy number variants using integrated high-resolution array CGH and massively parallel DNA sequencing. *Nat Genet*, v.42, n.5, p.400-5, maio 2010.

PASTUSZEK, P., KRECICKI, T., ZALESSKA-KRECICKA, M., JELEN, M., RAK, J., KRAJEWSKA, B. Histological and electron microscopic investigation of Reinke's edema. *Pol. J. Pathol*, v. 54, p.61-64, 2003.

POLISENO, L., SALMENA, L., ZHANG, J., CARVER, B., HAVEMAN, W.J., PANDOLFI, P.P. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, v. 465, n.7301, p. 1033–8, jun. 2010.

QIAO, J., FANG, C.Y., CHEN, S.X., WANG, X.Q., CUI, S.J., LIU, X.H., JIANG, Y.H., WANG, J, ZHANG, Y., YANG, P.Y., LIU, F.. Stroma derived COL6A3 is a

potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics. *Oncotarget*, v. 6, n.30, p.29929-46, out.2015.

QIU, J.J., YAN, J.B. Long non-coding RNA LINC01296 is a potential prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol*, v.36, n.9, p.7175-83, set.2015.

RUMMUKAINEN, J., KYTOLA, S., KARHU, R., FARNEBO, F., LARSSON, C., ISOLA, J.J. Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 126, n. 1, p. 1-7, apr. 2001.

SATO, H., MINEI, S., HACHIYA, T., YOSHIDA, T., TAKIMOTO, Y. Fluorescence in situ hybridization analysis of c-myc amplification in stage TNM prostate cancer in Japanese patients. *Int J Urol*, v. 13, n. 6, p. 761-6, jun. 2006.

SCHURMANS, S., POLIZZI, S., SCOUMANNE, A., SAYYED, S., MOLINA-ORTIZ, P.. The Ras/Rap GTPase activating protein RASA3: from gene structure to in vivo functions. *Adv Biol Regul*, v. 57, p.153-61, jan.2015.

SEMLALI, A., AL AMRI, A., AZZI, A., AL SHAHRANI, O., ARAFAH, M., KOHAILAN, M., ALJEBREEN, A.M., ALHARBI, O., ALMADI, M.A., AZZAM, N.A., PARINE, N.R., ROUABHIA, M., ALANAZI, M.S.. Expression and new exon mutations of the human Beta defensins and their association on colon cancer development. *PLoS One*, v.10, n.6, e0126868, jun.2015.

THANAWALA, V., KADAM, V.J., GHOSH, R. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Curr Drug Targets*, v. 9, n. 10, p.887-94, out.2008.

THIBEAULT, S.L., GRAY, S.D., LI, W., FORD, C.N., SMITH, M.E., DAVIS, R.K. Genotypic and phenotypic expression of vocal fold polyps and Reinke's edema: a preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v. 111, n. 4, p.302-9, abr.2002.

THIERAUF, J., VEIT, J.A., GRÜNOW, J., DÖSCHER, J., WEIBINGER, S., WHITESIDE, T., BEUTNER, D., QUAAS, A., PLINKERT, P., HOFFMANN, T.K., HESS, J.. Expression of Submaxillary Gland Androgen-regulated Protein 3A (SMR3A) in Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer Res*, v.36, n. 2, p.611-5, fev.2016.

WANG, J.T., GONG, S.S. Effects of protein kinase CK2 α on apoptosis and ultrastructure of laryngeal carcinoma cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v. 90, n. 40, p. 2869-72, nov. 2010.

YANG, M., PARK, J.Y., TAE, K. Genome-wide evidence of XPC alteration in laryngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 12, n.6, p. 1477-81, 2011.

YOUNKIN, S.G., SCHARPF, R.B., SCHWENDER, H., PARKER, M.M., SCOTT, A.F., MARAZITA, M.L., BEATY, T.H., RUCZINSKI, I. A genome-wide study of

inherited deletions identified two regions associated with nonsyndromic isolated oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, v. 103, n.4, p.276-83, abr.2015.

ZHANG, B., XU, Y.H., WEI, S.G., ZHANG, H.B., FU, D.K. FENG, Z.F., GUAN, F.L., ZHU, Y.S., LI, S.B. Association study identifying a new susceptibility gene (AUTS2) for schizophrenia. *Int J Mol Sci*, v. 15, n.11, p.19406-16, out.2014.

Tabela 1 – Alterações histopatológicas no Edema de Reinke

Autores	Pacientes	Displasia/leucoplasia/carcinoma <i>in situ</i>
MELO et al (2001)	113	6 casos - leucoplasia (5,3%)
MARCOTULLIO et al (2002)	125	6 casos - displasia moderada (4,8%) 3 casos - carcinoma <i>in situ</i> (2,4%)
PASTUSZEK et al (2003)	261	16 casos - displasia (6,1%) 21 casos - leucoplasia (8%)
MARTINS et al (2009)	54	6 casos - epitélio normal (11,1%) 38 casos - displasia leve (70,37%) 8 casos - displasia moderada (14,8%) 1 caso - displasia severa (1,8%) 1 caso - carcinoma <i>in situ</i> (1,8%)
LIM et al (2014)	189	170 casos - epitélio normal (89,9%) 16 casos - displasia leve (8,4%) 02 casos - displasia moderada (1%) 01 caso - displasia severa (0,5%)

Tabela 2 – Ganhos, perdas e deleções compartilhados por mais de um paciente

Patient	Chr	Cytoband	Start	Stop	Gain	Loss	Deletion	Probes	Gene Names
2	chr1	q44	248.727.929	248.808.452	x			7	<i>OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>
6	chr1	q44	248.727.929	248.808.452			X	7	<i>OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>
1,3	chr3	q26.1	162.514.534	162.619.141			X	6	Sem genes descritos
2, 5 e 7	chr8	p11.22	39.237.438	39.374.789	X			12	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
6	chr8	p11.22	39.222.367	39.330.526		X		10	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
6	chr8	p23.1	7.169.490	7.753.583		x		8	<i>DEFB4B, DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104B, DEFB104A, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105A, DEFB105B, DEFB107A, DEFB107B, PRR23D1, PRR23D2, FAM90A7P, FAM90A10P, SPAG11A, DEFB4A</i>
7	chr8	p23.1	7.239.491	7.753.583		x		7	<i>DEFB105B, DEFB107A, DEFB107B, PRR23D1, PRR23D2, FAM90A7P, FAM90A10P, SPAG11A, DEFB4A</i>
2, 3, 6, 8	chr11	q11	55.377.910	55.450.788	x			8	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>
1	chr11	q11	55.422.379	55.450.788			x	4	<i>OR4C6</i>
1 e 3	chr12	p13.31	9.637.323	9.687.190	x			4	Sem genes descritos
1, 3, 8	chr14	q11.2	19.376.762	20.414.232		x		14	<i>OR11H12, LOC642426, POTE3, LOC101929572, POTEH-AS1, DUXAP10, LINC01296, BMS1P22, BMS1P18, BMS1P17, POTE4, LOC100508046, OR11H2, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>
7	chr14	q11.2	20.332.444	20.414.232	x			7	<i>OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>
6	chr14	q11.2	22.554.846	22.976.316	x			38	Sem genes descritos
8	chr14	q11.2	22.489.904	22.952.279	X			42	Sem genes descritos
2	chr15	q11.2	20.432.851	22.873.747		x		42	<i>miR-3118-4, miR-3118-3, miR-3118-2, POTE3, POTE4, POTE2, NF1P2, miR-5701-3, miR-5701-1, miR-5701-2, LOC646214, CXADRP2, LOC101927079, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, miR-1268A, REREP3, miR-4509-3, miR-4509-2, miR-4509-1, GOLGA8DP, GOLGA6L1, GOLGA6L22</i>
5	chr15	q11.2	21.272.376	22.765.687		x		25	<i>GOLGA8DP, GOLGA6L1, GOLGA6L22</i>

Tabela 3 – Ganhos, perdas e deleções raras

Patient	Chr	Cytoband	Start	Stop	Gain	Loss	Deletion	Probes	Gene Names
1	chr4	q13.1	60.403.039	60.482.470			x	5	Sem genes descritos
2	chr13	q34	114.747.920	114.773.099	x			4	<i>RASA3</i>
3	chr10	p14	6.677.672	6.845.446		x		9	<i>LOC101928150, LINC00706, LINC00707</i>
4	chr2	q37.3	237.826.846	238.245.191	x			22	<i>COPS8, COL6A3, LOC93463</i>
5	chr7	q11.22	69.520.507	69.563.017			x	5	<i>AUTS2</i>
7	chr4	q13.3	71.162.798	71.283.216		x		10	<i>CABS1, SMR3A, SMR3B, PROLI</i>
7	chr8	p23.3 - p11.21	1.522.999	42.738.998	x			2418	Cobre todo o braço curto do cromossomo 8
7	chr8	q11.1 - q24.3	46.943.457	146.066.584	X			5132	Cobre todo o braço longo do cromossomo 8

Chr – cromossomo em que foi constatada a alteração; *Cytoband* – região do cromossomo em que foi constatada a alteração; *Start* - região de início da alteração mapeada no genoma humano (hg19); *Stop* - região de término da alteração mapeada no genoma humano (hg19); classificação da alteração em ganho (*Gain*), perda (*Loss*) ou deleção (*Deletion*); *Probes* (número de sondas alteradas, sendo considerado como significativo quatro ou mais sondas alteradas no intervalo); *Gene names* (genes envolvidos na alteração, quando descritos nas bases de dados)



Foto 1 – Pregas vocais normais (laringoscopia indireta)

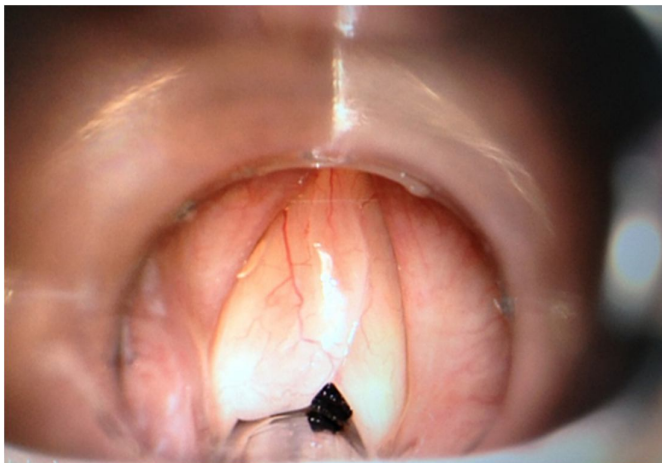


Foto 2 – Edema de Reinke (laringoscopia direta)

Figura 1 – Regiões em que foram encontrados os ganhos, perdas e deleções em mais de um paciente

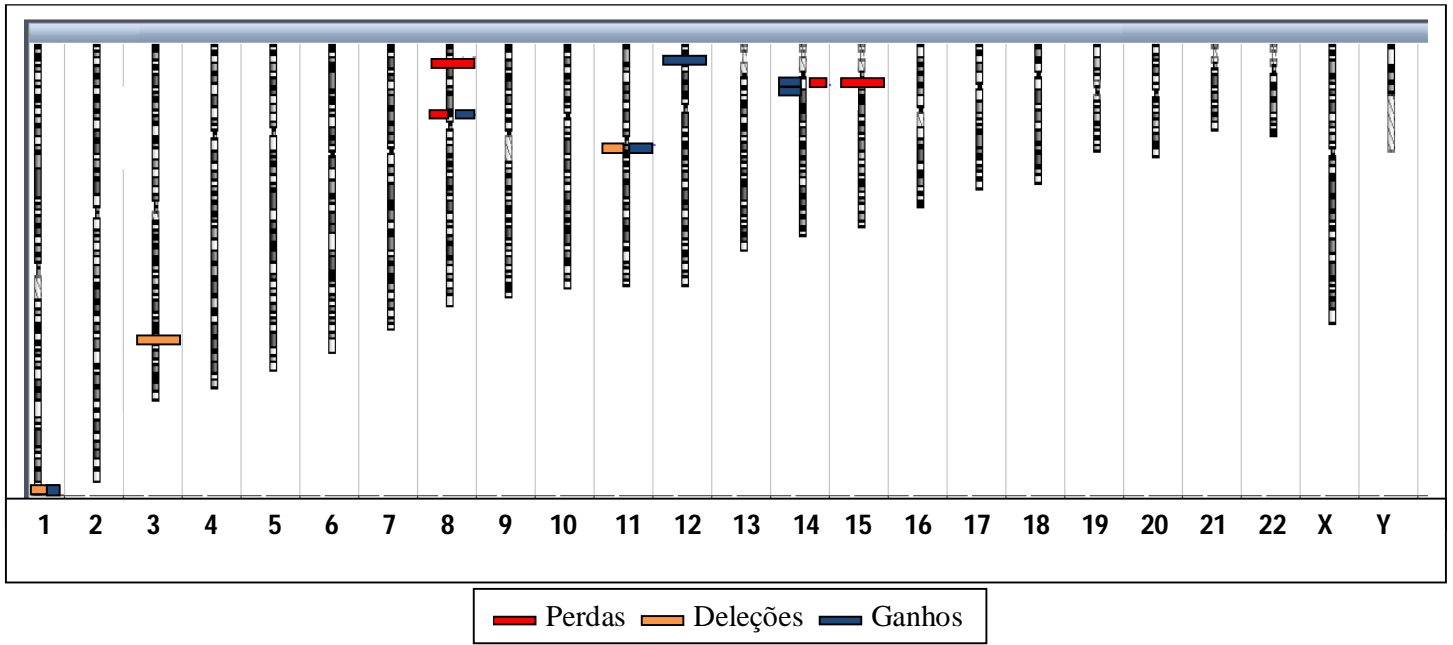


Figura 2 – Alteração considerada rara: ganho em 2q37.3 (caso 4)

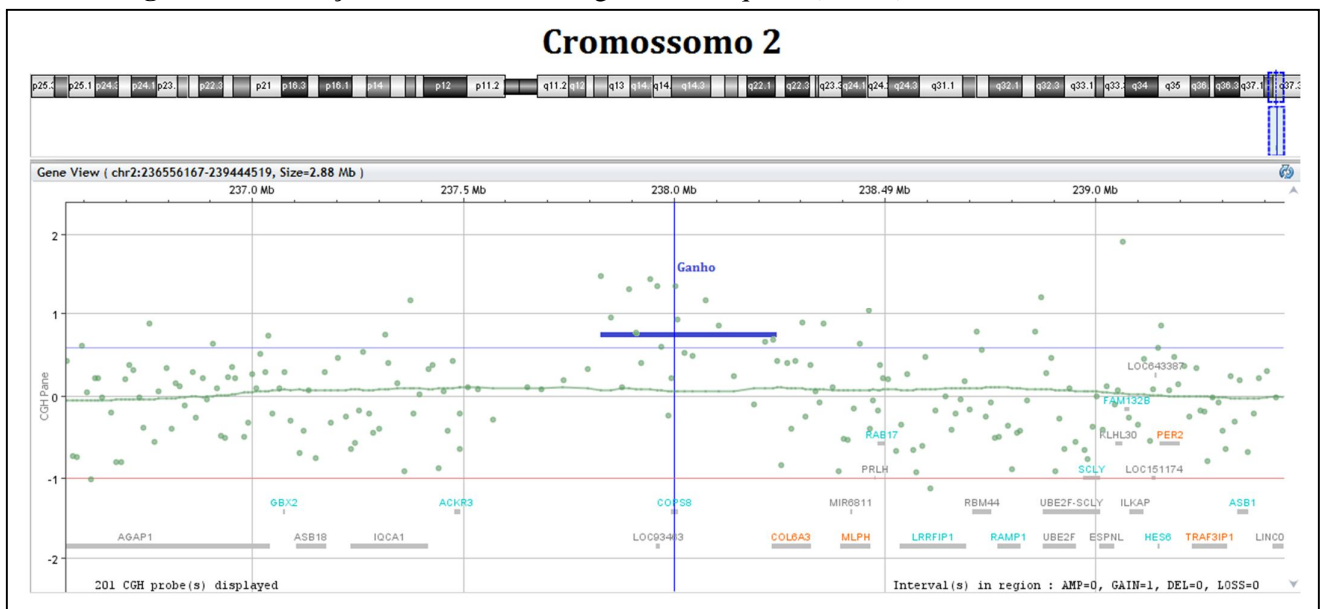


Figura 3 – Alteração considerada rara: deleção em 4q13.3 (caso 7)

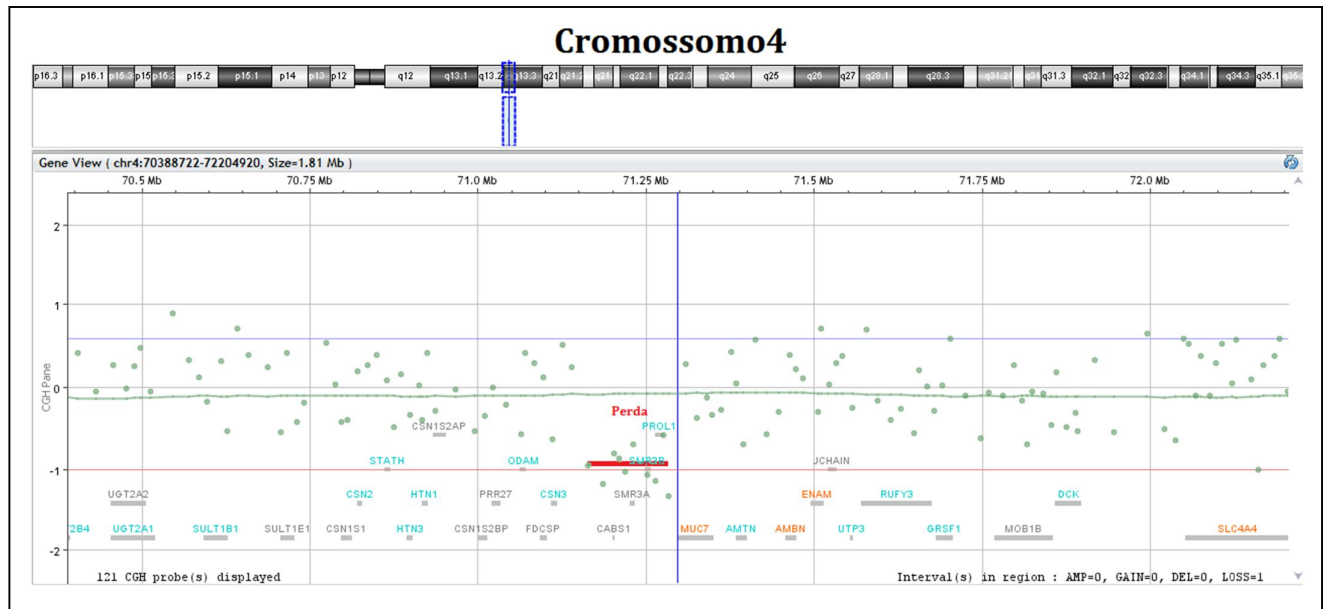


Figura 4 – Alteração considerada rara: deleção em 7q11.22 (caso 5)

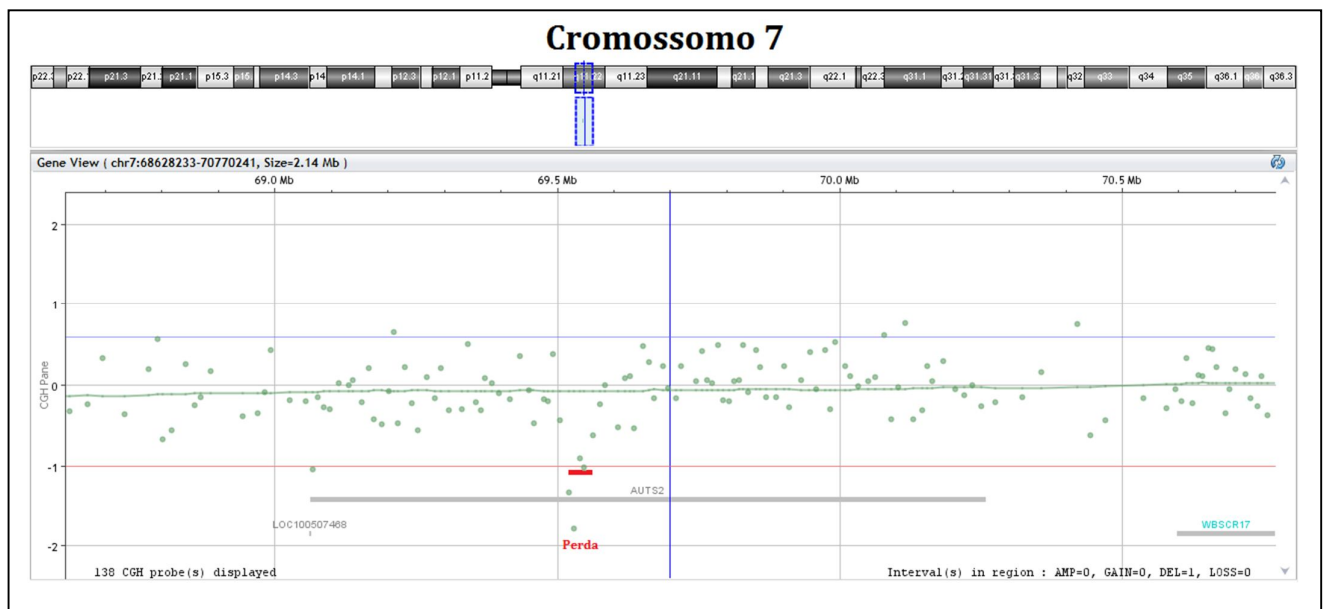


Figura 5 – Alteração considerada rara: perda em 10p14 (caso 3)

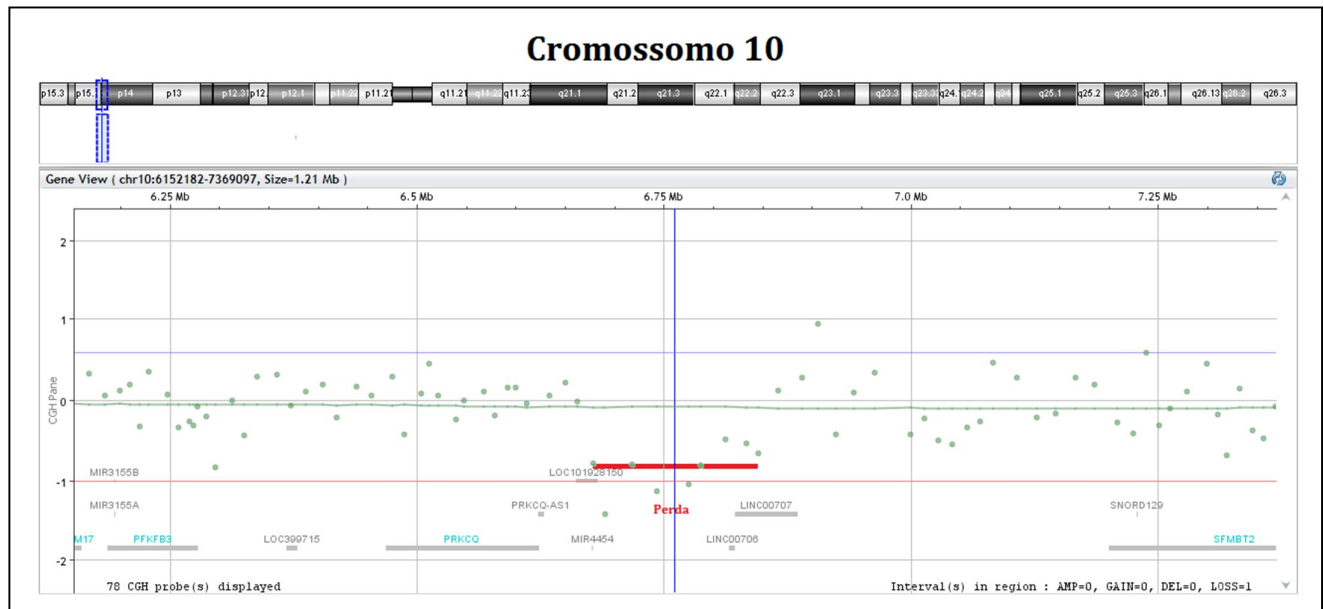


Figura 6 – Alteração considerada rara: ganho em 13q34 (caso 2)

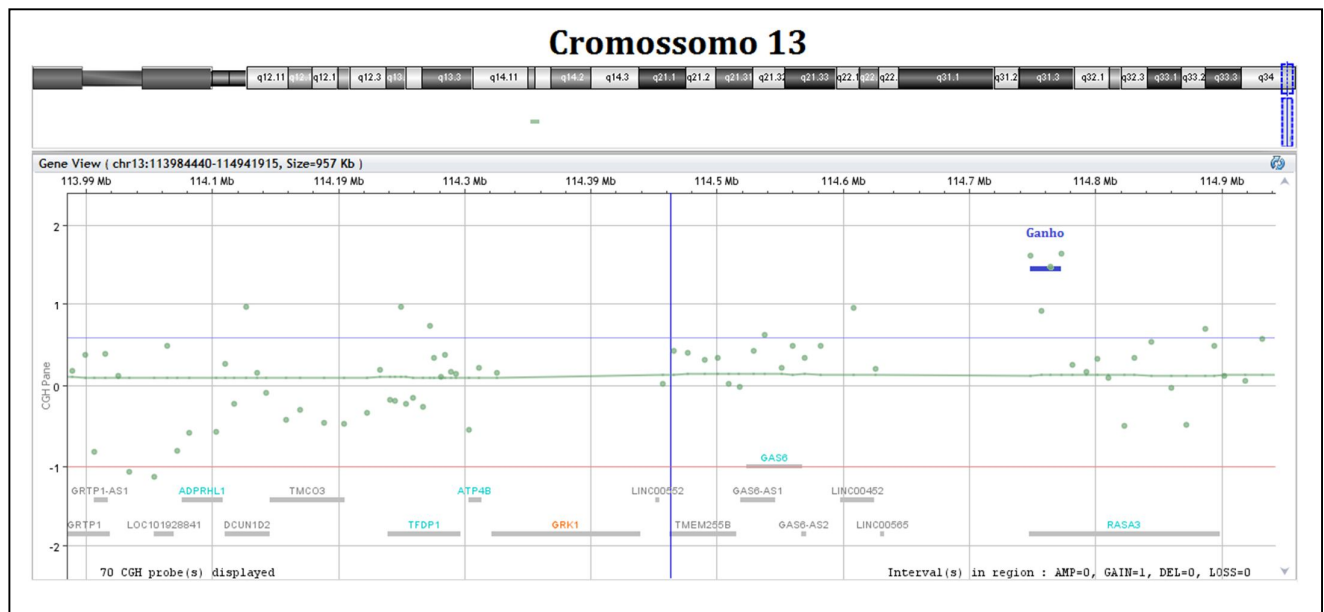


Figura 7 – Alteração considerada rara: ganho em 8p23.3-p11.21 (caso 7)

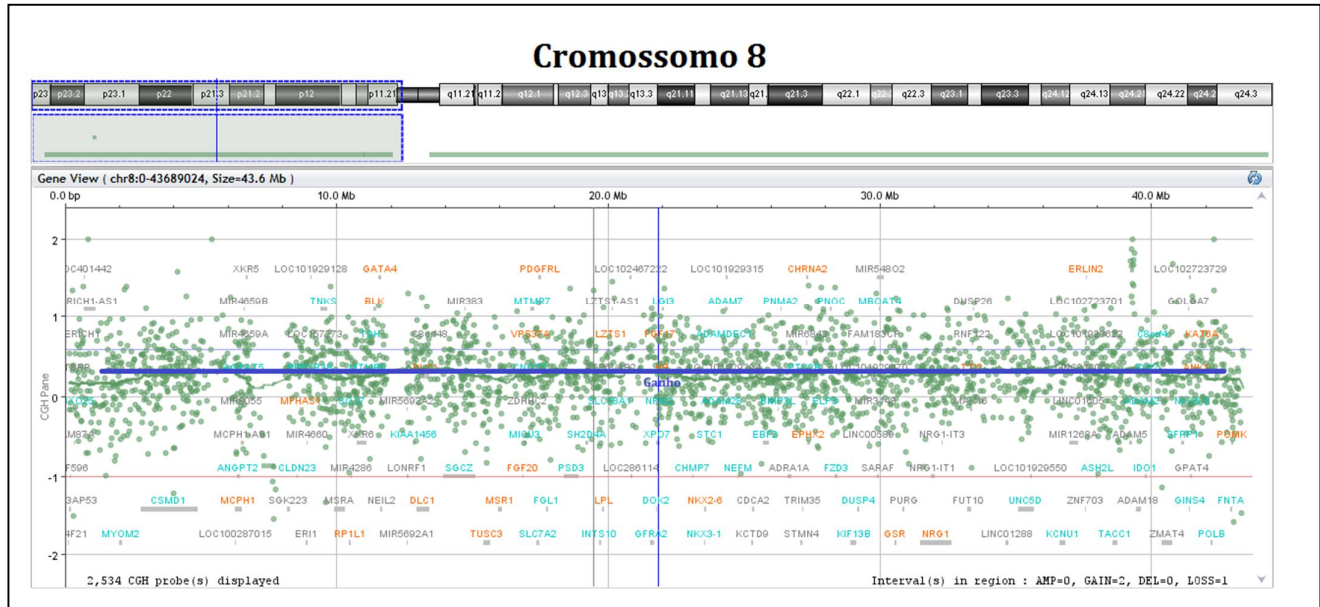


Figura 8 – Alteração considerada rara: ganho em 8q11.1-q24.3 (caso 7)

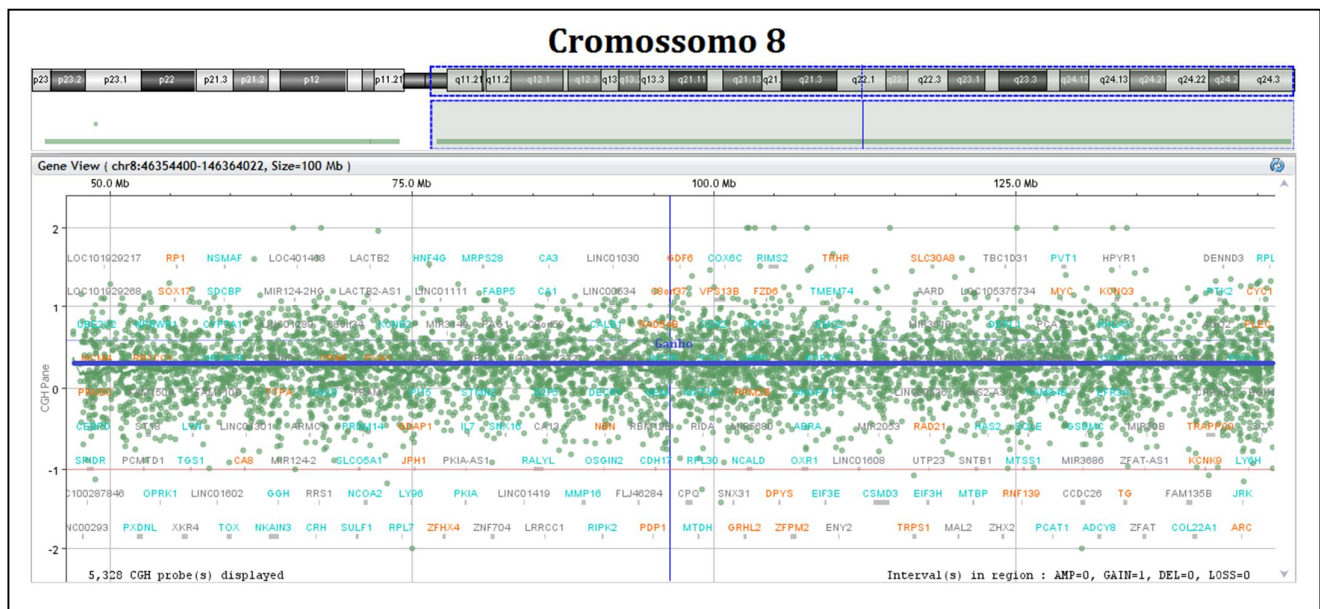


Figura 9 – Redes de interação proteína-proteína – CNAs comuns a mais de um paciente

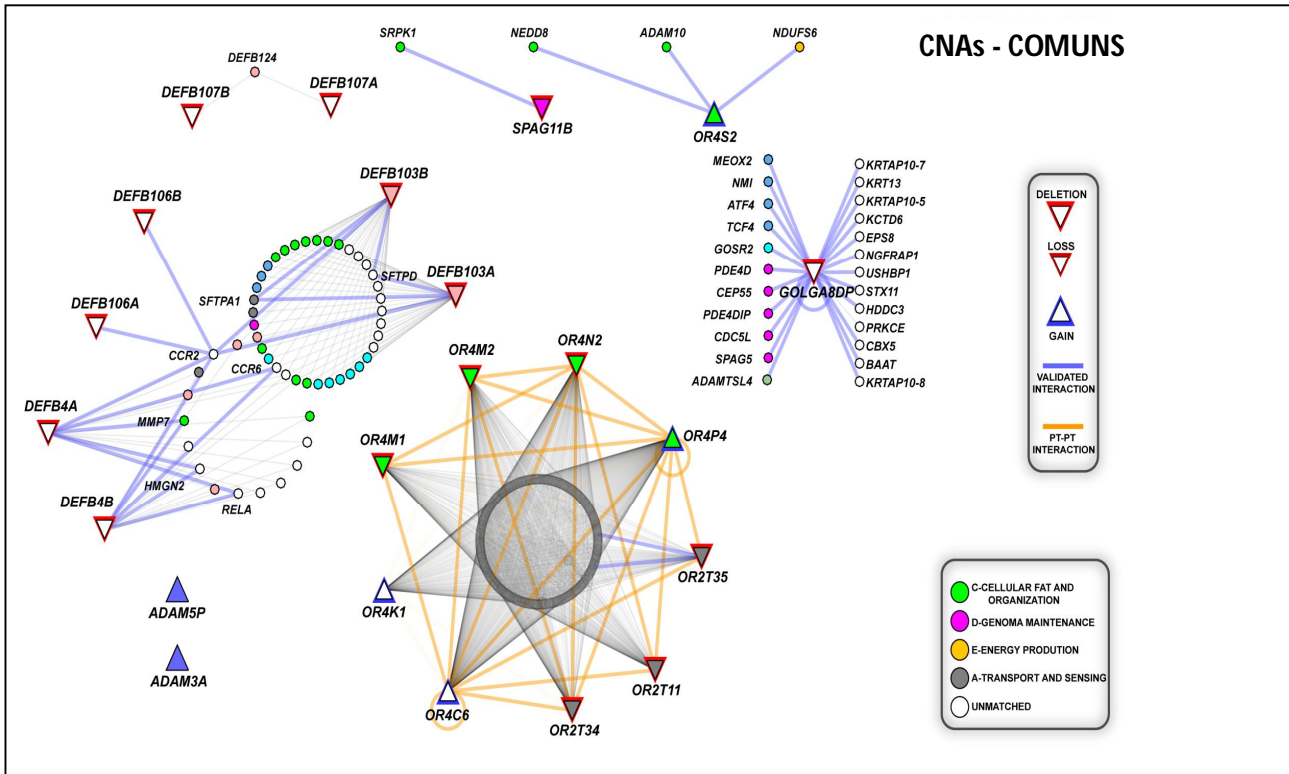


Figura 10 – Redes de interação proteína-proteína – CNAs raras

