

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/02/2018.



**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.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Pintor dos Reis  
Co-orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Titular Silvia Regina Rogatto  
Prof.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Pintor dos Reis  
Co-orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Titular Silvia Regina Rogatto  
Prof.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> 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 imunoe expressão 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

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

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	3
<b>3. OBJETIVO</b>	3
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	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
<b>5. RESULTADOS</b>	6
<b>6. DISCUSSÃO</b>	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
<b>7. CONCLUSÃO</b>	16
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	17

## Lista de Tabelas

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

## Lista de Fotos

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

## Lista de Figuras

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

## **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- $\kappa$ 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 $\gamma$  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., MANDAHN, 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 $\alpha$  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.