



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

Luciana Albina Reis Rosa

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE
RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE E ASSOCIAÇÃO
DE RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE OROFARINGE**

Dissertação de Mestrado

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências de Botucatu

LUCIANA ALBINA REIS ROSA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE
RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE E ASSOCIAÇÃO
DE RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE OROFARINGE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração – Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Rosa, Luciana Albina Reis.

Identificação de marcadores moleculares de resposta à quimioterapia neoadjuvante e associação de radioterapia e quimioterapia em pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe / Luciana Albina Reis Rosa. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Silvia Regina Rogatto

Capes: 20200005

1. Boca – Câncer. 2. Vírus do papiloma. 3. Carcinoma de células escamosas.

Palavras-chave: Biologia molecular; Carcinoma epidermóide de orofaringe; Genética; HPV; Resposta ao tratamento.

“Não me dêem fórmulas certas, por que eu não espero acertar sempre. Não me mostrem o que esperam de mim, por que vou seguir meu coração. Não me façam ser quem não sou. Não me convidem a ser igual, por que sinceramente sou diferente. Não sei amar pela metade. Não sei viver de mentira. Não sei voar de pés no chão. Sou sempre eu mesma, mas com certeza não serei a mesma pra sempre.”

Clarice Lispector

Dedicat6ria

Aos três pilares que me mantém erguida:

DEUS...

...Que com todo seu amor e dedicação nunca deixou que o caminho mais fácil e bonito me ludibriasse quanto aos desafios da vida e que sempre, nos meus momentos de fé ou desespero, se demonstrou presente e prestativo...

FAMÍLIA...

...Desde o princípio, foram vocês que me mostraram a essência da vida!... Tudo o que sou hoje, sou grata integralmente à vocês!

Obrigada pelo ombro, pelo apoio incondicional e pelo amor, acima de tudo...

AMIGOS e AMORES...

...Que graça teria a vida sem um bom amigo! Dedico a todos que fizeram ou fazem parte da minha vida, que estavam presentes pra secar uma lágrima ou simplesmente para não deixar que elas caíssem... Aos que me fizeram chorar de tristeza ou de alegria... Pela sinceridade e eternidade dessas amizades!

Ao meu noivo, Thiago Sacoman, pelo apoio, paciência, compreensão e amor incondicional durante essa fase! Sua atenção foi essencial para que eu chegasse onde cheguei!

Agradecimientos

À Universidade Estadual Paulista UNESP...

...Ao Instituto de Biociências (IBB) e À Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)

...Ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu

...Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IB

...Ao Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu

Ao Hospital do Câncer A. C. Camargo

Ao Hospital do Câncer de Barretos

...À **FAPESP** pela bolsa e ao **CNPq** pelo auxílio ao projeto e bolsa...

À minha orientadora...

...Silvia Regina Rogatto, por ter me dado a oportunidade de aprender e colaborar com o NeoGene laboratório, acreditando sempre que podemos ser melhores!

Aos colaboradores desse trabalho... aos Doutores Luiz Paulo Kowalski, André Lopes Carvalho e Ulisses Ribaldo Nicolau.

Aos membros do **NeoGene Laboratório** e **CIPE**... Que me ensinaram que o trabalho pode ser agradável, apesar da dura rotina e das inúmeras dificuldades encontradas no caminho...

Ana, Anderson, André, Ariane, Carol, Cássia, Deborah, Elô, Eliane, Fábio, Fabíola, Fernanda, Francine, Georgia, Graziela, Haydée, Hellen, Juan, Julia, Lívia, Luciane, Marcia, Mateus, Miriam, Nair, Priscila, Renata Bueno, Renata Canevari, Rodrigo, Rogério, Sandra, Sandra Regina, Sara e Yukie, e minha orientadora, Silvia Rogatto... Obrigada por tudo pessoal... As lições aprendidas jamais serão esquecidas!

Resumo e Abstract

RESUMO

Os relatos em literatura que relacionam preditores biológicos de resposta à radioterapia e ou quimioterapia em carcinomas de orofaringe (CEO) são limitados e a maioria se baseia em grupos de tumores de diferentes sítios anatômicos. Os objetivos deste estudo foram investigar marcadores biológicos que poderiam atuar como potenciais preditores de resposta à quimioterapia de indução seguido de radioterapia, e associá-los com o padrão de infecção pelo HPV e dados clínico-patológicos. Trinta e sete casos de CEO foram avaliados quanto à infecção pelo HPV, 32 casos para alterações no número de cópias (CNAs) por CGH-*array* e 22 casos tiveram seu perfil de expressão gênica avaliado em relação ao tecido normal e adjacente da orofaringe. O subtipo HPV16 foi o mais prevalente entre eles (8/37), seguido do HPV18 (2/37) e HPV26 (2/37) e HPV16/18 (1/37). As análises de CGH-*array* foram realizadas na plataforma 4x180k (Agilent). A análise dos dados foi realizada usando o programa *Nexus Copy Number v5.0* (Biodiscovery) e seguido de comparação com o *Database of Genomic Variants*. Foram identificadas 3222 alterações no número de cópias genômicas (CNAs) com prevalência de perdas heterozigotas (46,6%), seguida de ganhos (40,7%), alto nível de ganhos (7,9%) e perdas homozigotas (4,8%). As alterações mais frequentes envolveram ganhos em 3q, 5p, 8q, 9q e 11q e perdas em 3p, 5q, 8p, 9p e 18q. Os casos HPV negativos (20) apresentaram um maior número de CNAs (média 117 CNAs/caso) comparadas aos pacientes HPV positivos (12), os quais apresentaram um perfil genômico menos complexo (média 73 CNAs/caso). Foram identificadas regiões genômicas capazes de diferenciar os tumores HPV positivos e negativos ($P < 0,05$), entre elas as perdas em 7q22.1 e 14q12 presentes exclusivamente nos tumores HPV positivos ($P = 0,044$). Foi realizada uma análise comparativa entre os casos que receberam carboplatina associada à RT (22 casos) para identificar CNAs capazes de prever a resposta completa (RC) ou parcial (RP) ao tratamento e doença progressiva (DP). Os pacientes com RC apresentaram perfil genômico tumoral menos complexo quando comparados aos demais, com uma média de 90 e 110 alterações totais por caso, respectivamente. As alterações encontradas nos cromossomos 1, 9, 10 e 19 foram frequentemente detectadas nos casos que apresentaram RP + DP comparados com os de RC. Entre essas alterações, perdas em 1p21.3-p21.2, 1p21.2-p21.1 e 1p21.1 e ganhos em 10p13-p12.33 e 10p12.31-p12.1 estavam alteradas exclusivamente nos casos que não apresentaram RC ($P \leq 0,017$). Foi observada uma

diferença significativa na sobrevida global na análise entre os pacientes com RC+RP e DP ($P=0,018$). O perfil de expressão gênica global dos 22 casos de CEO disponíveis foram avaliados na plataforma 4x44K, *Agilent*. Após a aplicação dos testes estatísticos, foram identificados 1937 genes diferencialmente expressos, sendo 49,4% com aumento e 50,6% com diminuição de expressão gênica. Os genes diferencialmente expressos (*cut-off* de 1,5) foram relacionados na análise funcional em redes biológicas que envolvem principalmente doença imunológica (*VEGFA*, *JUN* e *MMP9*); câncer, doença genética e ciclo celular (*CDKN2A*, *Histona h3*, *CDH1*); morte celular, expressão gênica e mecanismo de infecção (*AR*, *IL2*, *ATXN1*); morfologia, crescimento e proliferação celular (*CDKN1A*, *AGT*, *VEGF* e *FN1*) (*Ingenuity Pathway Analysis*; IPA). Na análise supervisionada dos CEOs segundo a presença (9 casos) ou ausência de HPV (13 casos), foram observados 54 genes diferencialmente expressos e que apresentavam funções conhecidas entre os dois grupos. Os genes com maiores *fold change* e que mostraram associação com processos tumorais foram *PARK7*, *LARP7*, *VIM* e *KRAS*. A análise integrada dos dados revelou 22 genes moduladores, entre eles, 16 apresentaram concordância direta entre a alteração genômica e transcriptômica (ganho genômico e aumento de expressão). Os demais genes moduladores apresentaram alteração inversa entre a variação no número de cópias e o nível de expressão gênica (ganho genômico e expressão diminuída). Essa correlação inversa pode ser explicada pela presença de miRNAs reguladores alterados que inibem a expressão dos transcritos. Foram investigados *in silico* os vários miRNAs que se mapeavam em regiões envolvidas em perdas ou ganhos genômicos. Estes miRNAs são potenciais reguladores de transcritos específicos podendo ser marcadores relevantes nos carcinomas de orofaringe. Os achados deste estudo sugerem um perfil molecular diferencial entre os grupos com resposta completa e parcial no tratamento dos carcinomas de orofaringe, segundo o padrão de infecção pelo HPV. A abordagem genômica e transcriptômica, assim como a análise integrada destes dados permitiu identificar genes que podem ser marcadores biológicos úteis para auxiliar na conduta terapêutica e proporcionar melhor qualidade de vida ao paciente.

ABSTRACT

There are few reports relating biological predictors of response to radiotherapy and or chemotherapy in oropharyngeal squamous cell carcinomas (OSCC), and most of them are based on different head and neck anatomical sites. The aims of this study were to investigate biological markers that could act as potential predictors of response to chemotherapy of induction followed by radiotherapy, and its association with HPV infection and clinicopathological data. Thirty-seven OSCC were evaluated for HPV genotyping, 32 cases for copy number alterations (CNAs) by array CGH and 22 cases were investigated by large scale transcription analysis. The subtype HPV16 was the most prevalent among them (8/37), followed by HPV18 (2/37) and HPV26 (2/37), and HPV16/18 (1/37). The array CGH analysis were performed using the 4x180k platform (Agilent). Data analysis were done by Nexus Copy Number v5.0 (Biodiscovery) software and compared with Database of Genomic Variants. A total of 3222 copy number alterations (CNAs) were identified with a prevalence of heterozygous loss (46.6%), followed by gains (40.7%), high level of gains (7.9%) and homozygous loss (4.8%). The most frequent gains involved 3q, 5p, 8q, 9q and 11q and losses on 3p, 5q, 8p, 9p and 18q. The HPV-negative cases (20) showed a higher number of CNAs (average 117 CNAs/case) compared to HPV-positive cases (12), which showed a less complex genomic profile (in average 73 CNAs/case). Genomic regions were able to differentiate between HPV positive and negative cases ($P < 0.05$), including losses on 7q22.1 and 14q12, which were detected exclusively in HPV-positive tumors ($P = 0.044$). A comparative analysis between the cases treated with carboplatin associated with RT (22 cases) was done aiming to identify chromosomal regions that could predict the complete (CR) or partial response (PR) to treatment and progressive disease (PD). Patients presenting CR had tumors with less complex genomic profile compared to the others, with an average of 90 and 110 total CNAs per case, respectively. Chromosomal alterations on 1, 9, 10 and 19 were frequently detected in tumors with PR+PD, compared with the CR. Among these changes, losses on 1p21.3-p21.2, 1p21.2-p21.1 and 1p21.1 and gains on 10p13-p12.33 and 10p12.31-p12.1 were found exclusively in cases with absence of CR ($P \leq 0.017$). A significant difference in overall survival analysis among patients with CR+PR and PD ($P = 0.018$) was verified. The global transcript analysis in 22 OSCC was obtained using 4x44K Agilent microarray platform. After the application of statistical tests, 1463 genes were

differentially expressed, 49.4% up-regulated and 50.6% down-regulated. The differential expressed genes (cut-off 1.5) were listed in functional analysis of biological networks (Ingenuity Pathway Analysis, IPA) that mainly involve immunologic disease (*VEGFA*, *MMP9* and *JUN*); cancer, genetic disease and cell cycle (*CDKN2A*, *histone H3* and *CDH1*), cell death, gene expression and mechanism of infection (*AR*, *IL-2* and *ATXN1*); morphology, cell growth and proliferation (*CDKN1A*, *AGT*, *FN1* and *VEGF*). The supervised analysis of OSCCs according the HPV status (9 positive and 13 negative) revealed 54 genes differentially expressed showing known functions. Genes with higher fold change and more associated with tumor processes were *PARK7*, *LARP7*, *VIM*, *KRAS*. The integrative analysis of data revealed 22 drivers genes; 16 of them showed direct correlation between transcriptomics and genomics analysis (genomic gain and overexpression). The remaining genes showed inverse correlation between CNAs and gene expression levels (genomic gains and downexpression). This inverse correlation may be explained by the presence of altered regulatory miRNAs that inhibit the expression of these transcripts. Several miRNA that are mapped in regions involved in genomic losses or gains have been investigated *in silico*. These miRNAs are potential regulators of specific transcripts involved in oropharyngeal carcinomas. The findings suggest a molecular profile of difference between the groups with complete and partial response in the treatment of oropharyngeal carcinomas, according to the HPV infection pattern. This study using genomic and transcriptomic approach allowed us to identify genes that may be useful biomarkers to aid in therapeutic management and improving patients life quality.

Sumário

SUMÁRIO

Introdução.....	1
1. Carcinomas de cabeça e pescoço (CCP).....	1
2. Epidemiologia.....	2
3. Papilomavírus Humano (HPV).....	4
4. Tratamento.....	7
5. Alterações Moleculares nos CCPs.....	11
5.1. Alterações no número de cópias genômicas.....	11
5.2. Expressão gênica global.....	15
Objetivos.....	21
Material e Métodos.....	22
1. Casuística.....	22
2. Esquema terapêutico.....	23
3. Extração de DNA total tumoral.....	30
4. Genotipagem do HPV.....	30
5. Avaliação da variação no número de cópias genômicas por CGH- <i>array</i>	31
6. Análise dos dados de CGH- <i>array</i>	33
7. Extração de RNA tumoral.....	34
8. Expressão gênica global.....	34
9. Análise dos dados de expressão gênica global.....	36
10. Análise integrada entre os dados de CGH- <i>array</i> e expressão gênica.....	38
11. Análise funcional.....	39
Resultados.....	41
1. Dados clínico-patológicos da casuística.....	41
2. Resposta clínica ao tratamento proposto.....	41
3. Genotipagem de HPV.....	44
4. Alterações no número de cópias genômicas.....	46
4.1. Associação das CNAs com a resposta ao tratamento.....	60
4.2. Alterações no número de cópias associadas ao HPV.....	64
4.3. Análise de sobrevida global.....	70
5. Análise da expressão gênica global	72
5.1. Influência do HPV no perfil de expressão gênica.....	79

6. Análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos.....	93
6.1. CGH- <i>array</i>	94
6.2. Perfil de expressão gênica.....	95
6.3. Integração dos dados – CONEXIC.....	95
6.4. Predição de regulação gênica por miRNA.....	97
6.5. miRNAs mapeados em regiões de ganhos e perdas genômicas.....	98
6.6. Meta-análise com dados públicos disponíveis no GEO.....	101
6.7. Análise funcional dos genes alterados.....	103
Discussão	107
Conclusões	152
Bibliografia	154

ÍNDICE DE TABELAS

Tabelas	
Tabela 1. Relatos publicados em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço usando CGH-arrays.....	15
Tabela 2. Relatos publicados em carcinomas epidermóides, incluindo orofaringe e usando arrays de expressão.....	20
Tabela 3. Resumos dos dados clínicos dos pacientes.....	27
Tabela 4. Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA de referência universal.....	35
Tabela 5. Distribuição da casuística segundo as variáveis clínico-patológicas e demográficas dos 37 pacientes com carcinoma de orofaringe avaliados no presente estudo.....	43
Tabela 6. Padrão de resposta a tratamento, infecção por HPV e dados clínicos relevantes dos pacientes com carcinoma de orofaringe e as análises efetuadas em cada caso.....	45
Tabela 7. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 32 pacientes com carcinoma de orofaringe ($P \leq 0,05$).....	52
Tabela 8. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos pacientes associados ao padrão de resposta ao tratamento à carboplatina nos 22 casos de carcinomas de orofaringe.	63
Tabela 9. Alterações genômicas exclusivas dos tumores HPV positivos ou negativos, encontradas em mais de 20% dos 32 casos de carcinomas de orofaringe.....	66
Tabela 10. Genes diferencialmente expressos relacionados às dez principais vias canônicas conhecidas.....	74
Tabela 11. Genes diferencialmente expressos relacionados com as principais redes biológicas.....	76
Tabela 12. Genes diferencialmente expressos com função conhecida identificados após análise de agrupamento hierárquico supervisionado segundo a presença ou ausência de infecção por HPV.....	81
Tabela 13. Genes diferencialmente expressos relacionados com as vias canônicas conhecidas e o score apresentado entre os carcinomas de orofaringe HPV+ e HPV-.....	84
Tabela 14. Genes diferencialmente expressos relacionados com as principais redes biológicas conhecidas e o score apresentado pra cada uma delas entre	87

os casos de carcinomas de orofaringe HPV+ e HPV-.....	
Tabela 15. Genes diferencialmente expressos relacionados com as principais redes biológicas conhecidas e os scores apresentados para cada uma delas nos casos HPV+ e HPV-.....	92
Tabela 16. Genes moduladores resultantes da análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos.....	96
Tabela 17. Genes identificados na análise integrada baseada nos achados de correlação inversa (ganho genômico/diminuição de expressão) e seus miRNAs preditos.....	97
Tabela 18. miRNAs mapeados em regiões de ganhos e perdas genômicas e a correlação entre a alteração no número de cópias e o padrão de expressão de seus genes preditos.....	99
Tabela 19. Meta-análise dos genes detectados em estudos prévios de expressão gênica global em carcinomas de cabeça e pescoço depositados no banco de dados GEO (<i>Genomic Expression Omnibus</i>).....	102
Tabela 20. Redes gênicas com os scores gerados a partir da associação dos 22 genes com o banco de dados do Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	104
Suplementos	
Tabela Suplementar 1. Questionários de qualidade de vida da Universidade de Washington e Inventário de Sintomas traduzido do M.D. Anderson (MDASI).....	i
Tabela Suplementar 2. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 32 pacientes com carcinoma de orofaringe.....	ii
Tabela Suplementar 3. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 32 carcinomas de orofaringe comparados quanto a infecção por HPV.....	x
Tabela Suplementar 4. miRNAs identificados em regiões genômicas alteradas no programa <i>Nexus Copy Number</i> entre os 32 casos de carcinomas de orofaringe.....	xv
Tabela Suplementar 5. Genes diferencialmente expressos entre os 32 casos de carcinomas de orofaringe e amostras normais de orofaringe pela análise de expressão gênica global.....	xvii

INDICE DE FIGURAS

Figuras	
Figura 1. Genotipagem do HPV pelo sistema <i>LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test</i> (Roche).....	44
Figura 2. Representação gráfica da proporção de carcinomas de orofaringe positivos e negativos para infecção pelo HPV entre as duas instituições participantes.....	46
Figura 3. Representação gráfica do número de alterações totais no genoma.....	47
Figura 4. Representação gráfica do número de alterações em cada cromossomo.....	48
Figura 5. Representação gráfica do tamanho (pb) das alterações envolvidas em ganhos e perdas genômicas.....	49
Figura 6. Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 32 casos de carcinomas de orofaringe avaliados pela técnica de <i>CGH-array</i>	50
Figura 7. Alterações no número de cópias apresentadas caso a caso (vertical) e por cromossomos (horizontal - cromossomo 1 ao Y) detectadas nos casos de carcinoma de orofaringe analisados por <i>CGH-array</i>	51
Figura 8. Representação gráfica das perdas e ganhos genômicas encontradas no cromossomo 3	56
Figura 9. Representação gráfica das alterações genômicas encontradas no cromossomo 8.....	57
Figura 10. Representação gráfica das alterações genômicas encontradas no cromossomo 9.....	58
Figura 11. Representação gráfica das perdas genômicas no cromossomo Y.....	59
Figura 12. Representação gráfica da média dos ganhos e perdas genômicas totais.....	61
Figura 13. Representação gráfica dos ganhos e perdas genômicas observados entre os tumores cujos pacientes apresentaram resposta completa ou não.....	62
Figura 14. Representação gráfica do número de ganhos e perdas genômicas totais observados para tumores HPV positivos e negativos.....	64
Figura 15. Representação gráfica dos ganhos e perdas genômicas observados para tumores HPV positivos e negativos.....	65
Figura 16. Clusterização hierárquica dos casos HPV positivos e negativos, e os	69

genes significantes que os diferenciam.....	
Figura 17. Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para a análise de sobrevida global nos pacientes com e sem infecção por HPV e sua associação com a resposta ao tratamento.....	70
Figura 18. Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para a análise de sobrevida global nos pacientes tratados com radioterapia associada à carboplatina entre os pacientes com resposta completa <i>versus</i> doença progressiva.....	71
Figura 19. Principais doenças, funções moleculares e celulares e vias canônicas com participação dos genes diferencialmente expressos.....	75
Figura 20. Representação esquemática das quatro principais redes biológicas que envolvem genes diferencialmente expressos em CE de orofaringe.....	78
Figura 21. Agrupamento hierárquico supervisionado realizado nos CEs de orofaringe segundo a presença ou ausência de infecção pelo HPV.....	80
Figura 22. Principais doenças, funções moleculares e celulares e vias canônicas com participação dos genes diferencialmente expressos nos casos HPV+ comparados aos HPV-.....	83
Figura 23. Representação esquemática das quatro principais vias canônicas para casos HPV+ quando comparados a HPV-.....	86
Figura 24. Representação esquemática das quatro principais redes biológicas para casos HPV+ quando comparados a HPV-.....	89
Figura 25. Principais doenças, funções moleculares e celulares na comparação dos casos HPV+ comparados aos HPV-.....	91
Figura 26. Etapas da análise dos dados de <i>CGH-array</i> e de expressão gênica em larga escala.....	93
Figura 27. Análise de segmentação realizada pelo <i>DNA Copy</i>	94
Figura 28. Representação esquemática das principais redes biológicas que envolvem genes com alteração genômica e transcritoômica.....	105
Figura 29. Principais doenças, funções moleculares e celulares e vias canônicas com participação dos genes diferencialmente expressos nos carcinomas de orofaringe.....	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluoro-uracil
ASR	<i>Age-standardized rate</i> (taxa ajustada pela idade)
Ca	Cálcio
CCP	Carcinoma de cabeça e pescoço
cDNA	<i>Complementary deoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico complementar)
CE	Carcinoma epidermóide ou Carcinoma de células escamosas
CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CEO	Carcinoma epidermóide de orofaringe
CDDP	Cisplatina
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (hibridação genômica comparativa)
CGH-array	<i>Array comparative genomic hybridization</i> (hibridação genômica comparativa em matriz)
CNA	<i>Copy number alterations</i> (alterações no número de cópias)
CNV	<i>Copy number variation</i> (variações no número de cópias)
CISH	<i>Chromogenic in situ hybridization</i> (hibridação cromogênica <i>in situ</i>)
cRNA	<i>Complementary ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico complementar)
Cy3	<i>Cyanine 3</i> (cianina 3)
Cy5	<i>Cyanine 5</i> (cianina 5)
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i> (deoxicidina trifosfato)
DGV	<i>Database of genomic variants</i> (banco de dados de variantes genômicas)
DNA	<i>Deoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (deoxinucleotídeo trifosfato)
dUTP	<i>Deoxyuridine triphosphate</i> (deoxiuridina trifosfato)
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (matrix extracelular)
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition</i> (transição epitélio mesênquima)
FDR *	<i>False discovery rate</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (hibridação fluorescente <i>in situ</i>)
gDNA	DNA genômico
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> (carcinoma hepatocelular)
HCL	<i>Hierarchical clustering</i> (clusterização hierárquica)
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (papilomavírus humano)
HPV +	HPV positivo

HPV -	HPV negativo
IHC	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA *	<i>Ingenuity pathways analysis</i>
iRNA	<i>Interference RNA</i> (RNA de interferência)
K	Potássio
LDH	Lactato desidrogenase
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (perda de heterozigose)
ND	Não disponível
Mg	Magnésio
miRNA	Micro RNA
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (metaloproteinase de matriz)
mRNA	RNA mensageiro
Na	Sódio
NA	<i>Not available</i> (não disponível)
NK *	<i>Natural killer</i>
NTP	<i>Nucleoside triphosphate</i> (nucleosídeo trifosfato)
OS	<i>Overall survival</i> (sobrevida global)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PET-CT	Tomografia por emissão de pósitrons computadorizada
PF	Quimioterapia de indução com cisplatina e 5-fluorouracil
QT	Quimioterapia
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RT	Radioterapia
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i> (PCR transcriptase reversa)
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcriptase PCR</i> (PCR transcriptase reversa quantitativa)
SAM *	<i>Significance Analysis for Microarray</i>
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvicA
TNM	Estádio clínico (Tumor, linfonodos comprometidos e metástase)
TLR *	<i>Toll-like receptor</i>
TPF	Quimioterapia de indução com docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracil
UICC *	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UCSC *	<i>University of California, Santa Cruz</i>
ULS *	<i>Universal linkage system</i>

Introdução

INTRODUÇÃO

1. Carcinomas de cabeça e pescoço (CCP)

Os carcinomas de cabeça e pescoço (CCP) representam um grupo heterogêneo de tumores agrupados devido a sua localização anatômica. Acometem mais frequentemente homens com idade superior a 50 anos e histórico de tabagismo e etilismo crônicos.

O CCP é um termo amplo que engloba alterações epiteliais malignas entre elas as provenientes dos seios paranasais, orofaringe, cavidade oral, laringe e hipofaringe. O principal subtipo é o carcinoma epidermóide ou de células escamosas (CE), ocorrendo em mais de 95% dos casos. A localização mais frequente é a cavidade oral (40% dos casos), seguida pela laringe (25%) e faringe (15%) (INCA, 2010). Dados do Instituto Nacional do Câncer mostram que, na população brasileira, há uma proporção de três casos no gênero masculino para cada caso no gênero feminino, localizados com maior incidência na cavidade oral.

Com aproximadamente 633.000 novos casos por ano e 355.000 mortes, os CEs de cabeça e pescoço (CECP), incluindo cavidade oral, lábios, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe e laringe representam um dos oito tumores mais comuns no mundo (Jacques *et al.*, 2010 - *GLOBOCAN 2008*; Jemal *et al.*, 2011 - *Global Cancer Statistics*). Nos Estados Unidos da América, a incidência e mortalidade por câncer na cavidade oral e faringe atingiram 36.540 e 7.880 casos, respectivamente, em 2010 (Jemal *et al.*, 2010) e a proporção de homens para mulheres é, muitas vezes, superior à proporção 2:1. A maioria dos casos é diagnosticada em estádios clínicos avançados. Em 50 a 80% dos pacientes são detectadas metástases em linfonodos cervicais (Kowalski *et al.*, 1994) e em 10% dos casos metástases à distância (Fletcher e Lindberg, 1966; Lindberg, 1972; Barnes e Johnson, 1986; Erkal *et al.*, 2001).

O desenvolvimento desta doença está relacionado com o acúmulo de danos envolvendo genes que controlam a proliferação, senescência, invasão, motilidade e sobrevivência celular (Califano *et al.*, 1996; Forastiere *et al.*, 2001; Ha e Califano, 2006). Estas alterações genéticas quase sempre ocorrem como resultado à exposição excessiva ao tabaco, álcool e outros elementos carcinogênicos que desencadeiam danos irreversíveis ao DNA, ocasionando alterações nas regiões codificadoras e regulatórias de genes supressores tumorais e oncogenes. O acúmulo destas mutações

possibilita que as células adquiram características tumorais, incluindo resistência à morte, proliferação descontrolada conferindo vantagem seletiva ao crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000). As células tumorais podem formar clones com capacidade de invasão e estímulo aumentado da angiogênese, levando ao estabelecimento de CEs mais invasivos e com maior potencial para desenvolver metástases (revisado por Duvvuri e Myers, 2009).

O CCP tem elevada chance de cura quando diagnosticado precocemente, mas a maioria dos pacientes se apresentam com doença inicialmente avançada (aproximadamente 2/3 dos casos). Tem sido assumido que, nas últimas duas décadas, a qualidade de vida dos pacientes com CCP aumentou como resultado do uso de técnicas cirúrgicas e radioterápicas mais elaboradas (Smith *et al.*, 2007; Vergeer *et al.*, 2009; Leemans *et al.*, 2011). Em contrapartida, a sobrevida desses tumores não tem melhorado significativamente, uma vez que os pacientes desenvolvem frequentemente recorrência locorregional, metástases à distância e segundos tumores primários (Leemans *et al.*, 2011).

Apesar dos recentes avanços na terapêutica, o prognóstico desses pacientes foi ligeiramente melhorado durante as últimas três décadas na maioria dos países, incluindo a Europa e Ásia (Mayne *et al.* 2006; Garavello *et al.*, 2010; *Global Cancer Statistics*, 2011). Porém, em diversos países do centro e leste da Europa (incluindo Hungria e Eslováquia), Canadá, Escandinávia e Austrália essa taxa permanece em ascensão. Além disso, as taxas de recorrência locorregional, metástase e segundo tumor primário permanecem elevadas (Vaamond *et al.*, 2003).

2. Epidemiologia

As taxas mais elevadas de carcinomas orais são encontradas no Brasil, Melanesia, centro-sul da Ásia e Europa Central e do Leste Europeu (Espanha e França). Em contrapartida, as menores taxas são encontradas na África, América Central e leste da Ásia (Japão e China) para ambos os sexos (Jacques *et al.*, 2010 - *GLOBOCAN 2008*).

A incidência especificamente para os carcinomas de orofaringe atinge 50.000 novos casos, sendo menor quando comparada à cavidade oral (270.000), laringe (160.000) e hipofaringe (130.000). A incidência mundial é concordante com a dos

CCPs e acometem mais de 2,5 homens para cada mulher (van Monsjou *et al.*, 2010). Dados do Instituto Nacional do Câncer mostraram que, na população brasileira, há uma proporção de três casos no gênero masculino para cada caso no gênero feminino, localizados com maior incidência na cavidade oral (INCA, 2010).

No Brasil, estima-se uma incidência (taxa ajustada pela idade - ASR) de 7,35 novos casos de carcinoma de orofaringe por 100.000 habitantes por ano, atingindo pouco mais de 1.000 novos casos por ano (Jacques *et al.*, 2010 - *GLOBOCAN 2008*). Para os carcinomas de cavidade oral, essa taxa chega a mais de 14.000 novos casos por ano (INCA, 2010).

Tem sido descrita uma alta influência sócio-econômica na incidência desses tumores, na qual os países emergentes apresentam menores proporções de carcinomas de orofaringe (1 a 10% dos CCP) comparadas com os países desenvolvidos (15 a 30% dos CCP). Além disso, as taxas de CCP continuam elevadas na maioria das regiões (Curado *et al.*, 1980; McKean-Cowdin *et al.*, 2000; van Monsjou *et al.*, 2010). Para a população brasileira, a proporção de carcinomas de orofaringe atinge mais de 13% dos casos totais de carcinoma de cabeça e pescoço (Jacques *et al.*, 2010 - *GLOBOCAN 2008*).

O consumo de tabaco e álcool são os principais fatores de risco para os CECP (Blot *et al.*, 1988; Tuyns *et al.*, 1988; Vineis *et al.*, 2004). Essas substâncias parecem apresentar um efeito sinérgico, potencializando seus efeitos carcinogênicos (Leemans *et al.*, 2011). Nas pessoas que nunca fumaram, o consumo substancial de álcool (ou seja, três ou mais drinques por dia) foi associado a um risco aumentado de CECP. Em adição, polimorfismos genéticos específicos em enzimas que metabolizam essas drogas também tem sido associados ao aumento de risco em carcinomas de cabeça e pescoço (Sturgis e Wei, 2002; Hashibe *et al.*, 2006; Olivieri *et al.*, 2010). O consumo de fumo sem o tabaco e a mastigação de “betel quid” (uma preparação de diversos ingredientes, incluindo o tabaco e as sementes da palmeira de betel, envolto em folha de betel) são fatores de risco bem estabelecidos para o câncer de cavidade oral (Warnakulasuriya, 2002; Proia *et al.*, 2006). Em contrapartida, o consumo de frutas e verduras tem sido associado a um risco reduzido de desenvolvimento de CECP (Pavia *et al.*, 2006; Argiris *et al.*, 2008).

A incidência aumentada de carcinomas de orofaringe nos países desenvolvidos parece estar associada à presença da doença em pacientes jovens, com tumores não

associados aos fatores de risco clássicos, como tabaco e álcool. Esse fato leva a uma associação cada vez maior de um subgrupo desses tumores relacionados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV - do inglês, *human papillomavirus*) (D'Souza *et al.*, 2009; *Global Cancer Statistics*, 2011).

3. Papilomavírus Humano (HPV)

O papilomavírus humano parece atuar como importante agente patogênico em um subgrupo de tumores da orofaringe. O HPV foi inicialmente identificado em 1949 (Strauss e Shaw, 1949) e desde então já foram caracterizados mais de 120 subtipos desse vírus (Villiers *et al.*, 2004; Campisi e Giovannelli, 2009; Pannone *et al.*, 2011). Esses vírus são partículas pequenas, compostas por DNA circular dupla fita com genoma composto por aproximadamente 8.000 pares de base, sendo sua infecção restrita às células basais da mucosa ou da camada epitelial (Marklund e Hammarstedt, 2011).

Os subtipos do HPV são divididos em dois grupos: os HPVs de alto e baixo risco, de acordo com seu potencial maligno. Os HPV de alto risco compreendem os subtipos HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, presentes em lesões escamosas de alto grau ou carcinomas invasivos, e os subtipos HPV 6, 11, 40, 42-44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89 são os considerados de baixo risco, podendo ser isolados de lesões epiteliais de baixo grau (Muñoz *et al.*, 2003; Shukla *et al.*, 2009). Mais recentemente, foram identificados subtipos com potencial oncogênico não bem estabelecido, denominados como “potenciais alto risco”, entre eles os HPV26, 53 e 66 (Muñoz *et al.*, 2003; Pannone *et al.*, 2011).

Dentre os HPVs de alto risco, somente os subtipos 16, 18, 31, 33 e 35 foram identificados como importantes na carcinogênese dos tumores de orofaringe, sendo o HPV16 o mais influente subtipo detectado nesses tumores, responsável por 90 a 95% dos tumores HPV positivos (Kreimer *et al.*, 2005; Dayyani *et al.*, 2010; Marklund e Hammarstedt, 2011).

O DNA genômico do HPV está presente em aproximadamente 25% dos CECP e aproximadamente 50% dos CEs de orofaringe estão associados ao HPV de alto risco (Kreimer *et al.*, 2005). A proporção de tumores HPV positivos varia substancialmente de acordo com o sítio anatômico tumoral. Este achado sugere que a proporção dos

tumores HPV positivos pode ser dependente de fatores geográficos e genéticos, além de fatores comportamentais (como hábitos sexuais) e a ausência de padronização da metodologia para a identificação destes vírus em tumores humanos.

Estudos epidemiológicos recentes indicam que os HPVs de “alto risco”, semelhantes aos que estão envolvidos no desenvolvimento e progressão dos carcinomas cervicais, estão também associados a CECP de localizações anatômicas específicas. O sítio anatômico mais associado à infecção por HPV no trato aerodigestivo é a orofaringe, especialmente as tonsilas e base da língua (Andl *et al.*, 1998; Frisch e Biggar, 1999; Weinberg *et al.*, 2006; D’Souza *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010).

Lohavanichbutr *et al.* (2009) avaliaram as diferenças entre carcinomas HPV positivos e negativos em amostras de CEs orais e de orofaringe. A presença do DNA do HPV ocorreu em 41 das 119 amostras analisadas (34,5%), com maior prevalência nos CEs de orofaringe (mais de 50%) comparados aos CEs orais (20%).

A presença dos subtipos HPV16, 33 ou 35 no núcleo das células tumorais foi identificada em 40% dos CCP pela técnica de imunistoquímica (IHC), sendo restrito aos tumores de orofaringe. Os pacientes com presença de HPV tiveram histórico de tabagismo inferior a 20 maços por ano e, entre os pacientes HPV positivos verificou-se uma alta associação com a expressão da proteína p16 (Fakhry *et al.*, 2008).

O subtipo HPV16 é particularmente ativo nos queratinócitos da mucosa oral sendo considerado o mais importante para o desenvolvimento dos carcinomas de orofaringe (Duvvuri e Myers, 2009). Este subtipo está associado com alterações genéticas características, entre elas o aumento da expressão da proteína supressora tumoral p16 e a ausência de mutações no gene supressor tumoral *TP53* (Westra *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; O’Regan *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2006; Dayyani *et al.*, 2010).

Os HPVs de alto risco produzem duas oncoproteínas virais, E6 e E7, necessárias para a replicação viral, estimulando a proliferação e atuando na transformação maligna e manutenção tumoral. Quando incorporados ao genoma humano, os genes *E6* e *E7* encontram-se geralmente com expressão aumentada, levando a alterações nas vias p14^{ARF}/MDM2/p53 e p16^{INK4a}/ciclina D/Rb, respectivamente. Esta integração pode levar tanto a ativação como a inativação de genes celulares envolvidos no processo tumoral.

A degradação da proteína supressora tumoral p53 pela oncoproteína viral E6 altera sua via e leva ao descontrole do ciclo celular, enquanto a degradação de pRb (oncoproteína E7) leva à inibição do fator de transcrição E2F, resultando na perda do controle celular e no aumento da proteína p16 (Havre *et al.*, 1995; Chung e Gillison, 2009; Marklund e Hammarstedt, 2011). Porém, nem sempre há uma correlação entre a presença do vírus e a ausência de mutação no gene *TP53* (Leemans *et al.*, 2011).

A proteína p16 é codificada pelo gene supressor tumoral *CDKN2A* e regula a atividade do complexo de ciclinas D-CDK4/6, os quais fosforilam Rb levando à liberação do fator de transcrição E2F. Essa liberação ativa a progressão do ciclo celular. O complexo protéico Rb-E2F atua como regulador negativo inibindo a expressão de *CDKN2A*. Portanto, a inativação funcional de *Rb* pela oncoproteína viral E7 leva a perda da inativação do transcrito p16 (Nevins, 2001; Marklund e Hammarstedt, 2011).

Os tumores associados ao HPV apresentam um padrão molecular distinto, com um mecanismo de tumorigênese independente dos efeitos mutagênicos do tabaco e álcool. Esses tumores são caracterizados pela ausência ou baixo número de alterações genéticas e epigenéticas nas vias clássicas de tumorigênese, com expressão diminuída de *TP53* selvagem, devido a sua inativação e degradação pela oncoproteína viral E6 (Jung *et al.*, 2010; Marklund e Hammarstedt, 2011).

Dentre os sítios de integração para os HPVs descritos, a região cromossômica envolvendo o gene *cMYC* (8q24.21) é um dos locais de inserção mais recorrentes em carcinomas cervicais, resultando na amplificação desse proto-oncogene e de genes proximamente mapeados, tanto na sequência de DNA viral quanto no DNA celular (Peter *et al.*, 2010). Esses dados demonstram que a integração do HPV pode levar a alterações em genes próximos ao local de inserção, acarretando no desenvolvimento de determinados tipos de tumores (Peter *et al.*, 2006).

Além das evidências do envolvimento do HPV na etiologia dos CEs de orofaringe (D'Souza *et al.*, 2007), parece haver uma correlação significativa entre a presença de infecção e a resposta mais efetiva ao tratamento dos pacientes com esse tumor (Duvvuri e Myers, 2009; Lassen *et al.*, 2009; Ang *et al.*, 2010).

A associação entre a infecção pelo HPV e a sobrevida global de pacientes com CCP foi avaliada por Fakhry *et al.* (2008) em 96 pacientes com CE de orofaringe e laringe em estágio III e IV. Os autores demonstraram que tumores HPV positivos são

mais responsivos à quimioterapia induzida quando comparados aos casos HPV negativos (82% e 55%, respectivamente). Da mesma forma, a resposta à quimioterapia associada à radioterapia foi maior nos tumores HPV positivos (84% *versus* 57%) e tanto a taxa de sobrevida global quanto de sobrevida livre de recorrência foram significativamente melhores nos tumores HPV positivos. Estes dados sugeriram que o HPV é impactante na sobrevida dos pacientes com CE de cabeça e pescoço.

Vários relatos em literatura indicam que o prognóstico dos pacientes com tumores de orofaringe HPV positivos é melhor do que nos casos HPV negativos, independentemente do status linfonodal, idade, estágio clínico, diferenciação tumoral ou gênero (Mellin *et al.*, 2000; Gillison, 2004; Weinberger *et al.*, 2006; Lindquist *et al.*, 2007; Fakhry *et al.*, 2008; Marklund e Hammarstedt, 2011). Além disso, esses tumores respondem melhor a diversos tratamentos, entre eles a cirurgia, radioterapia convencional e fracionada, quimioterapia de indução, quimioterapia adjuvante e quimioterapia de indução associada à quimioterapia adjuvante (Licitra *et al.*, 2006; Fakhry *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009; Ang *et al.*, 2010).

Os mecanismos exatos que levam a um melhor prognóstico nos casos associados ao HPV ainda não foram plenamente elucidados. Estudos em literatura apontam a correlação inversa entre a infecção pelo HPV e o status de TP53 como um dos fatores de bom prognóstico, sendo uma possível explicação à resposta apoptótica mediada pelo TP53 intacta nos tumores HPV positivos. Outra possibilidade seria a presença de fatores imunológicos relacionados aos tumores cujo fator carcinogênico principal é a infecção pelo HPV (Gillison *et al.*, 2000; Daí *et al.*, 2004; Spanos *et al.*, 2009; Marklund e Hammarstedt, 2011).

4. Tratamento

O diagnóstico e a terapia desta neoplasia são realizados com base no estadiamento clínico e achados clinico-patológicos porém, tumores morfolologicamente semelhantes e no mesmo estágio podem apresentar comportamentos completamente distintos devido aos diferentes padrões de expressão gênica (Irié *et al.* 2004).

Muitos avanços tem sido feitos no tratamento multimodal dos CECP, incluindo o aumento do uso de quimioterapia adjuvante, bem como nas técnicas de radiação, tais como a radioterapia com intensidade modulada (IMRT). Estas melhorias contribuíram para melhorar o controle locorregional e a sobrevida global ao longo das últimas duas décadas (Al-Sarraf *et al.*, 1998; Jeremic *et al.*, 2000; Denis *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011).

Atualmente, o tratamento considerado padrão para tumores avançados de orofaringe envolve quimioterapia concomitante a radioterapia ou cirurgia seguida de quimioterapia e radioterapia neoadjuvante. Entretanto, apenas 30-50% dos pacientes com doença localmente avançada sobrevivem mais de três anos, mesmo após os avanços nas técnicas cirúrgicas e o reconhecido benefício da terapia combinada com radioterapia e quimioterapia (Mendenhall *et al.*, 2008).

A cirurgia é a opção de escolha somente nos casos em que o tumor está delimitado em comprometimento da função. Mais da metade dos pacientes já apresenta metástases regionais ao diagnóstico, o que contribui para reduzir a expectativa de sobrevida (Kowalski *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). Na maioria dos centros, a cirurgia não é considerada primeira opção de tratamento para os tumores avançados da orofaringe (Pignon *et al.*, 2000; Erkal *et al.*, 2001).

No princípio dos anos 80, a quimioterapia foi introduzida no tratamento dos casos de CE avançados e foi observada significativa diminuição na incidência de metástases à distância e aumento no controle locorregional (Kohno, 2004). O procedimento de escolha atual para a preservação do órgão é a associação entre a radioterapia com quimioterapia concomitante (Lacy *et al.*, 1999, Bourhis *et al.*, 2006, Budach *et al.*, 2006), e isto se baseia na potencialização dos efeitos citotóxicos *in vitro* da radioterapia por alguns quimioterápicos (Schilsky, 1992). Entretanto, os mecanismos exatos responsáveis pela radiosensibilização não estão elucidados.

Alguns estudos clínicos revelam que pacientes tratados com radio e quimioterapia combinados apresentam melhores resultados nas sobrevidas global e livre de recorrência, com melhor controle locorregional da doença quando comparados com pacientes tratados somente com radioterapia convencional (Merlano *et al.*, 1996, Adelstein *et al.*, 1997, Pignon *et al.*, 2000). Apesar da possibilidade do uso de terapias combinadas apresentarem maior toxicidade (Posner *et al.*, 2007), estudos recentes demonstram a possibilidade de aumento das taxas de

controle locorregional sem comprometer a qualidade de vida dos pacientes tratados com este protocolo (Curran *et al.*, 2007).

Estudos com regimes combinados (quimioterapia e radioterapia) mostraram melhores resultados quando comparados ao tratamento sequencial (quimioterapia de indução seguida de radioterapia isolada) (Merlano *et al.*, 1996; Adelstein *et al.*, 1997; Pignon *et al.*, 2000) com aumento de 8% na sobrevida global e melhor controle locorregional da doença (Adelstein *et al.*, 2000).

Quinze a 30% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço desenvolvem metástase e, tem sido demonstrado que a terapia combinada com cisplatina associada à radioterapia não tem impacto relevante na incidência de metástase à distância. Desta forma, os taxanos foram incorporados ao regime de indução como o 5-fluorouracil (5-FU) e a cisplatina (Forastiere *et al.*, 2001; Choong e Vokes, 2008).

Atualmente, existe um enorme interesse em avaliar o valor da quimioterapia de indução, contendo drogas consideradas mais ativas, seguidos de terapia combinada (quimioterapia associada à radioterapia). Regimes de indução contendo três drogas (docetaxel, cisplatina e 5-FU) mostraram superioridade quando comparados à cisplatina e 5-FU (Curran *et al.*, 2007). Entretanto, questiona-se o papel do 5-FU durante a fase de indução, pois seu acréscimo tem que ser associado a redução da dose das outras drogas, hoje consideradas mais ativas contra o câncer de cabeça e pescoço.

Kim *et al.* (2011) estudaram uma nova abordagem com quimioterapia de indução seguida por cetuximabe e radioterapia concomitante, tendo resultados aceitáveis e eficazes. Embora o limitado tamanho amostral (17 pacientes, sendo 14 de orofaringe), o controle locorregional em dois anos foi de 85%. Bonner *et al.* (2006), em um estudo de fase III, relataram a superioridade do cetuximabe associado à RT *versus* RT isolada, no grupo que utilizou RT foi detectado um controle loco-regional em dois anos de 50%. A superioridade dos resultados encontrados por Kim *et al.* (2011) pode ser devido à combinação de quimioterapia de indução agressiva seguida por um regime de tratamento concomitante que os estudos anteriores não utilizaram.

Essa superioridade também foi demonstrada quando comparados com os estudos de Posner *et al.* (2007), no qual os pacientes foram randomizados para receber a quimioterapia de indução com docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracil (TPF) ou cisplatina e 5-fluorouracil (PF), seguido por terapia semanal concomitante com

carboplatina e radioterapia. A sobrevida livre de progressão estimada em dois anos foi de 53% e a sobrevida estimada de três anos foi de 62% no grupo TPF. Kim *et al.* (2011) apresentaram 91% de sobrevida livre de progressão nos 17 meses (média) de seguimento. Seus resultados favoráveis podem ser devido à menor toxicidade causada pelo uso do cetuximabe ao invés da carboplatina. Os autores também relataram uma resposta completa (RC) à quimioterapia de indução de 29,4% de resposta e resposta parcial (RP) em 100% dos demais pacientes. Essas taxas são superiores às comparados com dados da literatura, que apresentaram RC em 8,5% e 68% de taxa de resposta após TPF (Vermorken *et al.*, 2007). Esta superioridade pode ser simplesmente associada ao grupo amostral utilizado.

Um estudo retrospectivo observou tolerância à quimioterapia de indução com cisplatina, docetaxel e 5-FU, seguida de radioterapia concomitante com cetuximabe em 46 pacientes de CECP (Buiret *et al.*, 2010). Este estudo reportou elevadas taxas de pacientes que completaram a terapêutica proposta, superando 90% dos pacientes de um subgrupo de casos com toxicidade aceitável. Apesar da especificidade do estudo em demonstrar a tolerância ao tratamento, a progressão da doença foi observada em 6,5% dos pacientes com resposta locorregional após a quimioterapia de indução (Buiret *et al.*, 2010).

Há poucos relatos em literatura que relacionam preditores biológicos de resposta à radioterapia e/ou quimioterapia em CE de orofaringe, e a maioria se baseia em grupos heterogêneos de tumores das vias aerodigestivas superiores (Weiss, 1993; Miyashita *et al.*, 1994; Gallo *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 1996; Raybaud-Diogenè *et al.*, 1997; Gallo *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1999; Dijkema *et al.*, 2000; Raybaud *et al.*, 2000; Grabenbauer *et al.*, 2000; Couture *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2003). Evidências demonstram que tumores que expressam a proteína supressora TP53 mutada e baixa proliferação celular estão associados com maior probabilidade de resposta negativa à radioterapia (Raybaud-Diogenè *et al.*, 1997). Da mesma forma, a infecção por HPV está associada aos tumores com comportamento biológico distinto dos tumores cujos pacientes fazem uso de tabaco e álcool (Fakhry e Gillison, 2006). Assim, a seleção de um grupo homogêneo de pacientes sob um mesmo regime terapêutico cujos tumores fossem avaliados por técnicas moleculares poderiam indicar marcadores de predição de resposta clínica podendo contribuir para a decisão de escolha de um tratamento mais adequado.

5. Alterações Moleculares nos CCPs

Estudos em larga escala tem sido utilizados em uma grande variedade de tumores humanos e com diferentes estratégias, permitindo a identificação de genes ou regiões genômicas que podem contribuir para a identificação de marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos. Com o desenvolvimento de poderosas ferramentas baseadas nos *microarrays*, a pesquisa biomédica tem sido revolucionada pela habilidade de realizar investigações em escala genômica.

Atualmente, tem sido evidenciadas inúmeras aplicações tanto dos resultados de análises de *arrays* de DNA (CGH-*array*), SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphisms* - polimorfismos de base única) quanto de transcritos do DNA (oligonucleotídeos ou cDNA *microarrays*) (Nazmul-Hossain *et al.*, 2008).

Há um número limitado de estudos em literatura que usaram as técnicas de *microarray* em CCPs, especialmente em carcinomas de orofaringe, assim como dados de expressão gênica global.

5.1. Alterações no número de cópias genômicas

Embora os resultados das análises de CGH-*arrays* nem sempre sejam concordantes, ganhos em 8q, 3q, 20q, 11q e 9q, além de perdas em 4q, 3p, 5q, 15q e 18q são as alterações genéticas prevalentes identificadas nos CEs orais (Leemans *et al.*, 2011). Regiões específicas são frequentemente relatadas nas comparações entre sítios tumorais distintos, infecção por HPV e resposta a tratamento.

Baldwin *et al.* (2005) utilizaram a plataforma *Whole genome tiling-path* (contendo 32433 BACs) em 20 amostras de CEs orais. Dentre as alterações detectadas, a perda em 3p foi a mais frequente, seguida das perdas envolvendo os cromossomos 4, 5q, 8p, 9p, 10q, 11, 18q e 21q. Ganhos em 8q, seguido de 3q e regiões menores em 9q, 11q (*CCND1*), 14q, e 20q, assim como 7p11.2 (*EGFR*) estavam presentes em 40% dos casos avaliados. Os autores relataram alterações não previamente descritas (presentes entre 7 a 15 dos 20 casos avaliados) incluindo ganhos em 3q23, 5p15.2 (*TRIO*), 7p12.3-13, 7q21.2 (*CDK6*), 7q35 e 11q22.2-22.3 (*cluster MMP*) e perdas em 2p15, 4q34.3 e 16q23.2. Os ganhos nos genes *TRIO* e *CDK6* foram validados por RT-PCR.

Em oito casos de carcinomas orais, Liu *et al.* (2006) relataram ganhos (*LMYC*, *REL*, *TERC*, *PIK3CA*, *MYB*, *MDR1*, *HRAS*, *GARP*, *CCND2*, *FES*, *HER2*, *SIS*, e *SRY*) e perdas genômicas (*p44S10*, *TIF1*, *LPL*, *MTAP*, *BMI1*, *EGR2*, e *MAP2K5*). Os autores também identificaram genes classificadores numa análise comparativa entre o tumor primário e a metástase (*TGFB2*, *CRBP1*, *PIK3CA*, *HTR1B*, *HRAS*, *ERBB3* e *STK6*) assim como genes que se mostraram associados à sobrevida global (*PRKCZ*, *ABL1* e *FGF4*). Eles também relataram que a expressão aumentada da proteína FGF4 estava associada a pior prognóstico e a perda da expressão de CRBP1 foi característica dos CE primários e metastáticos.

Também em carcinomas orais, O'Regan *et al.* (2006) avaliaram 20 amostras por CGH-arrays e compararam os achados em pacientes com idade superior a 40 anos (Grupo 1) e igual ou inferior a 40 anos (Grupo 2). Pacientes não fumantes do grupo 2 apresentaram consideravelmente menos alterações que os demais pacientes (fumantes e não-fumantes do grupo 1 e fumantes do grupo 2). Tumores dos pacientes com >40 anos apresentaram deleções envolvendo 3p e 9p21, além de ganhos nas regiões 3q, 5q, 7p, 8q, 11q e 20q. No grupo 2, principalmente entre os não-fumantes, não foram detectadas alterações já relatadas em carcinomas orais. A deleção de *CDKN2A* estava presente em 50% dos casos do Grupo 1 e ausente no grupo 2. Os autores concluíram que os pacientes jovens não-fumantes com carcinoma oral (grupo 2) apresentaram uma menor instabilidade genômica em comparação aos pacientes com carcinomas de orofaringe com mais de 40 anos.

Sparano *et al.* (2006) relataram frequentes ganhos (>35%) em 3q, 5p, 8q, 9q e 20q e perdas (>40%) em 3p, 8p, 13q e 18q entre os 21 carcinomas orais avaliados por CGH-array. Genes associados à via de resposta a danos no DNA estavam frequentemente alterados, incluindo *BRCA1*, *BRCA2*, *FANCD2* e *FANCG*. Outros genes relacionados a síndromes de cânceres hereditários foram relatados como alterados incluindo *VHL*, *MLH1*, *XPC* e *RB1*.

Em um estudo de CGH cromossômico com 117 CECP de pacientes encaminhados para radioterapia, Bauer *et al.* (2008) realizaram análise de sobrevida multivariada, na qual ganhos em 1q e 16q, assim como perdas em 18q foram capazes de prever a redução na sobrevida livre de progressão locorregional (sobrevida livre de LRP) independentemente dos fatores prognósticos conhecidos. Foram detectados dois grupos de CECP caracterizados por diferenças significativas em regiões do

cromossomo 13, sendo um grupo correlacionado com pacientes não anêmicos e outro grupo, casos predominantemente anêmicos. Foi realizada a técnica de CGH-arrays em uma plataforma de BACs para validar ganhos em 16q em 5 amostras. Esta análise demonstrou o envolvimento significativo de 16q24.3. Utilizando FISH, os autores detectaram aumento do número de cópias de *FANCA*, membro da via da Anemia de Fanconi/Câncer de mama. Além disso, foram detectadas amplas deleções nas regiões que contém os genes *FANCD2* (3p), *FANCC* (9q), *MRE11* (11q), *BRCA2/FANCD1* (13q) e em 18q. Estes dados indicaram potenciais marcadores prognósticos em CECP que poderiam explicar a baixa sobrevida de um subgrupo de pacientes.

Da mesma maneira, Smeets *et al.* (2009) investigaram os padrões de alterações cromossômicas de 39 CEs orais e de orofaringe HPV negativos. As perdas em 3p e os ganhos em 3q26 e 8q24 foram as principais alterações genômicas detectadas, presentes em mais de 80% dos casos avaliados. Foram identificados três grupos distintos: um grupo quase sem alterações cromossômicas ou “silencioso” (N=8), um segundo grupo com níveis relativamente elevados (N=26), e por último o grupo que apresenta níveis muito elevados de alterações cromossômicas (N=5). Esta classificação foi significativamente associada com a sobrevida ($p=0,003$), com os melhores índices do grupo geneticamente “silencioso” e a pior sobrevida no grupo com maiores níveis de alterações. O perfil “silencioso” foi significativamente associado com o tipo selvagem *TP53* ($p<0,05$), ausência de consumo de álcool e pacientes do sexo feminino. Esta classificação de CEs orais e de orofaringe foi confirmado em um conjunto independente de 89 carcinomas orais, sendo essa descoberta importante para futuros estudos básicos e clínicos.

Mais recentemente, Jung *et al.* (2010) avaliaram a presença e o genótipo dos HPVs e a transcrição do RNA de E6/E7 em 231 carcinomas de cabeça e pescoço (138 de orofaringe - base de língua e 93 de hipofaringe ou cavidade oral). Por meio da análise de CGH-array, oito carcinomas de orofaringe HPV positivos e com expressão de E6/E7 foram comparados com 83 tumores HPV negativos (30 deles de orofaringe: 24 positivos e 6 negativos). Os tumores HPV positivos possuíam menos alterações genéticas que são comuns nos tumores HPV negativos, como amplificações em 11q13 e 3p25 e perda em 9p21 e 3p. Quando comparados com os tumores exclusivamente da orofaringe, os tumores positivos apresentaram perda em 16q22-q24 e diminuição da expressão dos 12 genes mapeados nessa região. Essa análise contribuiu para a identificação de genes diferencialmente expressos e regiões cromossômicas que

podem ser utilizadas como marcados dos CCPs HPV positivos, destacando a importância da determinação da carga viral do HPV e de seus transcritos na estratificação clínica dos pacientes (Jung *et al.*, 2010).

Cha *et al.* (2011) relataram regiões com ampliações presentes no tumor de sete pacientes de CE orais, comparados com áreas de displasia oral adjacente e margem cirúrgica normal por CGH-*array* (plataforma Agilent 44K). Os autores detectaram ampliações nos CEs orais envolvendo *FAM5B*, *TIPARP*, *PIK3CA*, *NLGN1*, *FGF10*, *HDAC9*, *GRM3*, *DDEF1*, *EDNRB*, *CHRD1*, e *HTR2C*, e deleções em *THRAP3*, *CTTNBP2NL*, *GATAD2B*, *REL*, *CKAP2L*, *RHOA*, *EIF4E3*, *PDLIM5*, *FBXO3*, *NEUROD4*, e *ABCA5*. Nas displasias, foi detectado ganho no gene *RNF36* e deleção em *CKAP2L* e *TCF8*. Essas alterações foram validadas por MLPA (do inglês, *multiplex ligation-dependent probe amplification*). Os achados indicaram que as CNVs detectadas nos três subtipos testados (normal, displasia e CE oral) podem estar associadas com a tumorigênese e a progressão tumoral.

Recentemente, Ambatipudi *et al.* (2011) investigaram 60 tumores de língua e gengiva (cavidade oral) por CGH-*array*. As alterações mais prevalentes foram ganhos em 3q (60%), 5p (50%), 7p (50%), 8q (73%), 11q13 (47%), 14q11.2 (47%), e 19p13.3 (58%) e perdas em 3p14.2 (55%) e 8p (83%). A análise univariada revelou que ganhos em 11q22.1-q22.2 e perdas em 17p13.3 e 11q23-q25 estavam associadas a recorrência local e menor sobrevida, respectivamente. Estes achados foram confirmados por FISH em núcleos interfásicos. O estudo demonstrou potenciais marcadores prognósticos em carcinomas orais.

A tabela 1 apresenta um resumo dos principais estudos que utilizaram a metodologia de CGH-*array* em carcinomas de cabeça e pescoço, as plataformas usadas assim como se foram realizados os experimentos de confirmação e ou validação dos dados.

Tabela 1. Relatos publicados em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço usando CGH-arrays, as diferentes plataformas e as metodologias de validação empregadas em cada estudo.

Autores	Plataforma array	Amostras	Validação
Baldwin <i>et al.</i> , 2005	<i>Whole genome tiling-path</i> (97299 elementos, representando 32433 BAC)	20 CEs microdissecados e 4 normais de localização inespecífica	RT-PCR
Liu <i>et al.</i> , 2006	CGH array <i>GenoSensor Array 300</i> (Vysis)	8 pares de CEs primários (4 boca, 2 língua e 2 gengiva) e metástase linfonodais	IHC
O'Regan <i>et al.</i> , 2006	CGH array <i>GenoSensor Array 300</i> (Vysis)	20 CEs orais (7 língua, 1 boca, 1 palato mole e 1 cav alveolar, sendo 10 >40 anos e 10 ≤ 40 anos)	—
Sparano <i>et al.</i> , 2006	4134 BAC clones (Ultra GAPS; Corning, NY)	21 CEs orais de localização inespecífica	—
Bauer <i>et al.</i> , 2008	3400 BAC clones (CodeLink, GE Healthcare) <i>whole human genome</i> 1Mb	117 CECP (12 laringe, 32 hipofaringe, 44 orofaringe e 29 cav. oral)	FISH
Smeets <i>et al.</i> , 2009	4062 BAC clones CGHarray	39 CECP (29 orais e 10 de orofaringe)	MSI
Jung <i>et al.</i> , 2010	<i>Genome-wide</i> CGH array (V6) com 4434 clones de PAC/BAC (600 kb espaçamento)	91 amostras (8 orofaringe HPV positivo; 30 orofaringe HPV negativo e 53 lesões negativas)	CISH, RT-qPCR
Ambatipudi <i>et al.</i> 2011	CGH oligonucleotideo array 105K (<i>Agilent Technologies</i>)	60 tumores de cavidade oral (7 língua e 53 boca)	I-FISH
Cha <i>et al.</i> , 2011	CGH oligonucleotideo array 44K (<i>Agilent Technologies</i>)	7 amostras de CE oral, displasia adjacente e margem cirúrgica normal	MLPA

—: Validação não realizada; **IHC**: imunistoquímica; **FISH**: hibridação fluorescente *in situ*; **I-FISH**: FISH em núcleos interfásicos; **RT-PCR**: Reação em cadeia da polimerase-transcrição reversa; **RT-qPCR**: RT-PCR quantitativa; **CISH**: hibridação *in situ* cromogênica; **MLPA**: *Multiplex ligation-dependent probe amplification*; **MSI**: *Micro Satellite Instability*.

5.2. Expressão gênica global

Os estudos de expressão gênica global tem como objetivo a identificação de genes diferencialmente expressos entre duas características associadas a tumores distintos ou entre subgrupos de tumores específicos que podem ser delineados para diferentes estratégias, como contribuir para a identificação de marcadores relacionados ao diagnóstico e prognóstico assim como para a detecção de perfis relacionados a resposta à terapia.

Dentre os estudos de expressão gênica global, Irié *et al.* (2004) utilizaram microdissecção a *laser* para isolamento das células tumorais de 11 CEs de cavidade oral primários (4 deles apresentavam metástases em linfonodos). Entre os genes analisados, cinco apresentaram-se com expressão aumentada, entre eles *VEGFR1*, *RhoC GTPase*, *FBP3*, *RFC38* e *gamma-IP10*, e cinco apresentaram diminuição de expressão na maioria dos casos analisados, entre eles *CLK3*, *CDKN1A*, *LEI*, *K10* e *NGAL*. Na análise em pacientes com e sem metástase, foram encontrados genes diferencialmente expressos, entre eles os genes *NGAL*, *CiclinaB*, *Upase*, *GMPsintetase* e *PAI-2* estavam aumentados no tumores que desenvolveram metástase. Esses genes são suspeitos de ser importantes para a histogênese e aquisição de capacidade de invasão e proliferação celular, tendo um importante papel no desenvolvimento de metástase tumoral.

Com o mesmo propósito, Somoza-Martín *et al.* (2005) avaliaram cinco amostras de CEs de cavidade oral e tecido normal adjacente. Entre os 3.757 genes analisados, 322 apresentaram aumento de expressão. Entre eles, 68 genes são codificadores de proteínas do metabolismo, 36 são transdutores intracelulares, efetores ou moduladores, 33 são fatores de transcrição e outros 33 são receptores celulares. Entre os 104 genes que mostraram diminuição de expressão, 19 genes são codificadores de fatores de transcrição, 17 são transdutores intracelulares, efetores ou moduladores, 12 codificam proteínas do metabolismo e 11 proteínas de ligação e transporte.

Em estudos de linhagens celulares derivadas de CEs de gengiva moderadamente diferenciadas, Nakamura *et al.* (2005) detectaram 12 genes com aumento de expressão na linhagem H-1R (resistente à cisplatina) comparada às linhagens H-1 (sensíveis à cisplatina). Entre eles foram relatados o envolvimento dos genes *MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *CD55* e *PGK1*. Os autores também relataram expressão diminuída do gene *Caveolina 1*, sendo esse achado confirmado por análise de expressão gênica quantitativa em tempo real.

Da mesma forma, Higo *et al.* (2005) identificaram nove genes diferencialmente expressos na comparação entre linhagens resistentes (HSC2) e sensíveis (HSC3) à radiação ionizante. Os genes *ASNA 1*, *TCP-20*, *Cyclophilin F*, *KIAA0218* e *HBp17* apresentaram aumento de expressão na linhagem HSC2 e os genes *Cytokeratin 18* e *DTNBP1* apresentavam-se com diminuição da expressão na

linhagem sensível a radiação. Sete dos nove genes foram confirmados como diferencialmente expressos por RT-PCR quantitativa. Segundo os autores o padrão de expressão do gene *Tcp-20* pode ser útil na identificação de CEs de cavidade oral resistentes ao tratamento radioterápico (Higo *et al.*, 2005).

Atualmente, tem sido demonstrada a diferença no perfil de expressão gênica entre tumores associados ou não ao HPV. Visando comparar o perfil de expressão gênica dos CEs de orofaringe HPV positivos (três amostras) e negativos (quatro amostras), além de tecido normal (quatro amostras), Martinez *et al.* (2007) utilizaram cDNA *microarray* e encontraram 397 genes diferencialmente expressos em CEs HPV positivos comparados com epitélio normal de cavidade oral. Entre estes estavam incluídos genes com expressão aumentada (*CDKN2A* - regulação do ciclo celular; *SFRP4* - diferenciação celular e *RAD51AP1* - reparo a danos no DNA) e diminuídas (*PRSS3* - proteólise). Também foram encontrados 162 genes diferencialmente expressos na comparação entre CEs HPV negativos e epitélio normal de cavidade oral. Nesta comparação foram relatados genes com expressão aumentada (*AKR1C3* - proliferação celular e *SNAPC1* - regulação da transcrição) e diminuída (*CLU* - envolvido em apoptose e *RBM3* - processamento do RNA). Na comparação entre CEs HPV positivos, HPV negativos e tecido normal, foram relatados 59 genes com expressão diferencial (aumento de expressão: *SYCP2* - estrutura nuclear e meiose; *RFC5* - reparo ao DNA e *ZNF238* - regulação da transcrição; diminuição: *KLK8* - proteólise e *CRABP2* - transdução de sinal). Esses resultados foram validados por RT-PCR quantitativa e revelaram padrões de expressão gênica específicos em CEs de orofaringe HPV positivos e negativos.

Em outro estudo de expressão gênica em larga escala, Slebos *et al.* (2006) analisaram 36 amostras (15 cavidade oral, 9 orofaringe, 9 laringe e 3 hipofaringe) dos quais sete casos de orofaringe eram HPV+. Entre o grupo HPV positivo, um dos genes com aumento de expressão mais significativo foi o *CDKN2A*, o qual codifica a proteína supressora tumoral p16(INK4A). Além dele, outros genes reguladores do ciclo celular (*p18* e *CDC7*), fatores de transcrição (*TAF7L*, *RFC4*, *RPA2* e *TFDP2*) e moléculas de adesão (*TCAM1*) estavam com aumento expressão nos tumores HPV+. Apenas dois genes apresentaram expressão diminuída nesse grupo de tumores (*NAP1L2* e *KIRREL*).

Chung *et al.* (2006) descreveram 75 genes altamente preditivos de recorrência em 40 amostras de CEs (incluindo 13 de cavidade oral, 11 de orofaringe e 5 de laringe) de 29 pacientes. Dentre os genes com aumento de expressão no grupo com recorrência, quatro (*KRT14*, *MMP2*, *SFN*, *LGALS1*) foram previamente associados a características de pior prognóstico (Chung *et al.*, 2004). A comparação do perfil de expressão gênica entre os tumores de alto e baixo risco de recorrência revelou que tumores de alto risco tem genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima desregulados, assim como aqueles envolvidos na sinalização de *NFKB* (*MYC*, *PTEN* e *HIFI-alpha*), importantes reguladores de crescimento celular e angiogênese.

Em um estudo comparando o perfil de expressão gênica entre CEs orais e leucoplasias (LPs), Kondoh *et al.* (2006) relataram 118 genes diferencialmente expressos. Primeiramente, foram identificados 27 genes com expressão diferencial entre 27 amostras de CEs orais e 19 de LPs. Após a análise supervisionada, detectaram-se 11 genes preditores capazes de discriminar entre CEs e LPs e sete genes que podem discriminar entre displasias leves e moderadas em nove amostras de CEs orais e 12 de LPs derivadas de língua. Entre os genes diferencialmente expressos, a redução da expressão de *TG-3*, *C1orf10* (família das *cornulinas*), *MGP*, *DPT* e *FosB* podem ser uma manifestação importante na transição entre lesões potencialmente malignas e malignas. Por outro lado, os genes *LAMC2*, *FST*, *CXL10* apresentaram aumento de expressão. Segundo os autores, este perfil de expressão gênica evidencia marcadores que podem ser utilizados como ferramentas diagnósticas.

Pyeon *et al.* (2007) avaliaram 84 CCPs, sendo 42 tumores CCP, 14 tecidos normais de cabeça e pescoço, 20 tumores cervicais e oito amostras cervicais normais. Tumores de cabeça e pescoço HPV+ e carcinomas cervicais apresentaram genes diferencialmente expressos comparados ao grupo de CCP HPV- incluindo genes reguladores do ciclo celular e genes testículo-específicos (*SYCP2*, *STAG3*, e *TCAM1*). Baseados no relato de Duensing e Munger (2004), os autores propuseram que estes genes podem contribuir para a instabilidade genômica induzida nos casos HPVs de alto risco.

Em 119 CEs orais e displasias e 35 tecidos normais analisados para expressão gênica global, Chen *et al.* (2008) identificaram 131 genes diferencialmente expressos. Utilizando análise de regressão, os autores relataram dez combinações sucessivas de

genes cuja expressão diferenciava os CEs e tecidos normais. O melhor modelo incluiu os genes *LAMC2*, *COL4A1*, *COL1A1* e *PADI1*. Após validação dos dados por RT-PCR quantitativa em tempo real, foi confirmada a expressão diferencial desses quatro genes em 48 amostras de CEs invasivos e 10 tecidos normais, além de 42 amostras de CECP e 14 controles. Os autores ainda sugeriram que o modelo proposto pode permitir o monitoramento de recorrência local e desenvolvimento de focos secundários de CEs primários, após validação em estudos com maior número amostral.

Embora vários autores tenham descrito genes diferencialmente expressos na comparação entre carcinomas de cavidade oral HPV positivos e negativos, Lohavanichbutr *et al.* (2009) não obtiveram esses resultados, porém, 446 sequências estavam diferencialmente expressas (347 genes conhecidos) nos CEs de orofaringe HPV positivos. As funções mais proeminentes desses genes são replicação e reparo do DNA e controle do ciclo celular. Alguns genes diferencialmente expressos nos CEs de orofaringe estavam envolvidos na sensibilidade à quimioterapia ou radioterapia (*TYMS*, *STMN1*, *CCND1* e *RBBP4*), sugerindo que as diferenças na biologia de CEs de orofaringe HPV positivos ou negativos podem ser importantes no gerenciamento destes pacientes, e podem contribuir para a conduta clínica a ser seguida nos CCP.

Na análise de expressão gênica entre os subtipos de HPVs e as características clínicas e histológicas, foi avaliado o perfil de expressão gênica em pacientes HPV negativos e aqueles que expressavam os transcritos E6/E7 em 48 tumores de orofaringe (Jung *et al.*, 2010). Foram detectadas alterações em genes como *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CXCL11*, *CXCL9*, *IL15*, *TCAM1*, *TAF7L*, *SYCP2*, *STAG3*, *SYNGR3*, *RASIP1* e *ABCA17P*, que estavam com expressão aumentada nos casos HPV positivos *versus* negativos. Por outro lado, foi relatada a diminuição da expressão gênica de *ANO1/TMEM16A*, *CTTN*, *PPFIA1*, *DHCR7*, *GAL*, *CCND1* (genes da região 11q13) e *MAGEA4*, *MAGEA12*, *MAGEA5*, *MAGEA11*, *CA12*, *CCNA1*, *CHRM3* e o oncogene *HMGA2* nos casos HPV positivos comparados aos negativos. Estes achados demonstram a importância da estratificação clínica quanto a presença de HPV no seguimento desses pacientes.

A tabela 2 apresenta os principais estudos de expressão gênica global descritos em literatura em carcinomas de cabeça e pescoço, as plataformas utilizadas e os métodos de validação e ou confirmação dos resultados.

Tabela 2. Relatos publicados em carcinomas epidermóides, incluindo orofaringe e usando *arrays* de expressão, as diferentes plataformas e as metodologias de validação empregadas em cada estudo.

Autores	Plataforma <i>array</i>	Amostras	Validação
Irié <i>et al.</i> , 2004	Human Cancer 1.2 Atlas cDNA <i>array</i>	11 CEs primários com e sem metástase	–
Higo <i>et al.</i> , 2005	“in-house” cDNA <i>microarray</i> 2201 sequências	Linhagens HSC2 (resistente) e HSC3 (sensíveis) a radioterapia	qRT-PCR
Nakamura <i>et al.</i> , 2005	“in-house” cDNA <i>microarray</i> 2201 clones derivados de CEs e tecido normal	Linhagens H-1R (resistente) e H-1 (sensitiva) à cisplatina	qRT-PCR
Somoza-Martín <i>et al.</i> , 2005	cDNA Atlas Glass Human 3.8 I <i>Microarray</i>	5 CEs oral e tecido normal adjacente	-
Kondoh <i>et al.</i> , 2006	cDNA <i>microarray</i> IntelliGene HS Human expression chip	27 CEs e 19 leucoplasias	qRT-PCR
Martinez <i>et al.</i> , 2007	cDNA <i>microarray</i> Affymetrix U133 2.0 Plus	11 amostras (3 HPV positivos, 4 HPV negativos e 4 normais)	RT-PCR
Chung <i>et al.</i> , 2006	<i>Affymetrix Human Genome X3P GeneChip arrays</i>	40 amostras de 29 pacientes (13 CO, 11 orofaringe e 5 laringe)	qRT-PCR
Slebos <i>et al.</i> , 2006	<i>Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 GeneChip arrays</i>	36 amostras (15 CO, 9 orofaringe , 9 Laringe e 3 hipofaringe)	qRT-PCR
Pyeon <i>et al.</i> , 2007	<i>Affymetrix U133 plus 2.0 GeneChip arrays</i> e HPV <i>microarrays</i>	84 amostras (42 tumores CP, 14 N, 20 tumores cervicais e 8 N)	Cultura celular, qRT-PCR, <i>Western blotting</i> e IHC
Chen <i>et al.</i> , 2008	cDNA <i>microarray</i> Affymetrix U133 2.0 Plus	CEs primários, displasia e tecido oral normal	RT-PCR quantitativa
Lohavanichbutr <i>et al.</i> , 2009	cDNA <i>microarray</i> Affymetrix U133 2.0 Plus	119 CEs primários (31 orofaringe) e 35 pacientes sem câncer	-
Jung <i>et al.</i> , 2010	<i>Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 GeneChip arrays</i>	48 tumores de orofaringe	CISH, qRT-PCR

-: Validação não realizada; **RT-PCR:** Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase; **qRT-PCR:** RT-PCR quantitativa em tempo real; **IHC:** imunistoquímica; **CISH:** hibridação *in situ* cromogênica.

Objetivos

OBJETIVOS

- (1) Genotipar as amostras para o HPV e comparar estes achados com os dados clínicos e moleculares;
- (2) Investigar potenciais marcadores biológicos por aCGH e análise global de transcritos seguida de análise integrada dos dados para identificar marcadores funcionais em carcinomas de orofaringe;
- (3) Analisar as redes e vias canônicas associadas aos genes que se mostraram alterados na análise integrada dos dados;
- (4) Identificar potenciais marcadores moleculares preditores de resposta à quimioterapia e radioterapia;
- (5) Correlacionar os achados com a sobrevida global dos pacientes.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

1. Casuística

Neste estudo foram incluídos 37 pacientes portadores de CE de orofaringe primários sem tratamento prévio, na faixa etária de 18 a 70 anos, diagnosticados com tumores T2, T3 ou T4, N0 a N3, sem metástase à distância (M0), com doença locorregional avançada e tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo e Hospital do Câncer de Barretos, Fundação Pio XII, Barretos. A condição de desempenho dos pacientes (escala de Karnofsky) era igual ou superior a 70, expectativa de vida estimada mínima de 6 meses, reserva medular adequada (leucócitos > 3,500/mm³, neutrófilos > 1,500/mm³, plaquetas > 100,000/mm³; hemoglobina > 9,0g/dl), função hepática adequada (bilirrubina total < 1.5 vezes o limite superior normal; TGO e TGP < 3 vezes o limite superior normal), função renal adequada (creatinina < 1.5 vezes o limite superior normal), aderência do paciente ao tratamento e proximidade geográfica que permitissem o acompanhamento adequado para a participação voluntária do estudo conforme especificado no termo de consentimento pós-informado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética das duas Instituições.

Os critérios de exclusão da participação dos pacientes foram a presença de doença cardíaca ativa ou não compensada por tratamento, infarto agudo do miocárdio nos seis meses prévios, infecção ativa presente e doenças sistêmicas concomitantes (consideradas sérias pelos critérios do investigador), presença de doença psiquiátrica severa, outra neoplasia primária. A participação do paciente em outro protocolo experimental também o excluiu do estudo.

As informações clínicas e o exame físico referentes aos pacientes, como peso, altura, condição de desempenho (Karnofsky), sinais vitais, mensuração direta dos tumores mensuráveis, sinais e sintomas existentes, exame hematológico (hemograma com plaquetas), exame bioquímico (Na, K, Mg, uréia, creatinina, Ca, albumina, fosfatase alcalina, TGO, TGP, LDH, bilirrubinas, urinálise, teste de gravidez para mulheres), depuração de creatinina (se indicado), questionário de qualidade de vida da Universidade de Washington validado para língua portuguesa, tomografia computadorizada ou ressonância magnética, raio X ou tomografia de tórax conforme a indicação foram criteriosamente coletados e incluídos em um formulário

padronizado. Quando possível, os resultados dos exames de imagem foram confirmados por PET-CT, exame locorregional, biópsia dos fragmentos tumorais e coleta de amostra de sangue para análise histológica.

Os formulários incluindo o termo de consentimento pós-informado, índice de Karnofsky (performance status), critérios de toxicidade (I a IV), critérios da OMS para avaliação de resposta, questionários de qualidade de vida (Universidade de Washington) e inventários de sintomas do MD Anderson validados em português encontram-se na Tabela Suplementar 1.

2. Esquema Terapêutico

Neste estudo foi utilizado um esquema de quimioterapia neoadjuvante consistindo de três ciclos de docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracil (TPF) (Posner *et al.*, 2007). A resposta ao tratamento foi avaliada após o segundo ciclo. O docetaxel foi administrado intra-venosamente (i.v.) 75mg/m² uma hora no primeiro dia (após pré-medicação iniciada na noite anterior: dexametasona 8mg por seis doses), cisplatina 100mg/m² i.v. duas horas no primeiro dia, precedida por hidratação com solução salina 0,9% além de maritol 12,5g e 5-fluorouracil 1000mg/m² i.v. administrado em infusão contínua nos dias um a quatro. Foi realizada antibioticoterapia profilática com ciprofloxacina 500mg a cada 12 horas por 10 dias consecutivos, a partir do quinto dia. O esquema quimioterápico foi repetido a cada três semanas por três ciclos e o ajuste de dose foi realizado de acordo com a toxicidade hematológica e não hematológica observada. A redução da dose de cisplatina e do docetaxel foi decidida a critério da equipe médica, porém, não foi reduzida devido a alopecia de qualquer grau.

Dos 37 pacientes incluídos no projeto, 23 deles receberam radioterapia associada à carboplatina ou cisplatina, sete com cetuximabe e um deles com cisplatina. Os demais não realizaram RT ou por óbito anteriormente ao término da QT de indução, ou por não responder bem à QT e ser submetido à cirurgia ou por outros fatores adversos ao tratamento.

Para o tratamento associado à radioterapia e carboplatina foi administrado 70Gy como dose total, 1,8Gy em fração única diária por cinco dias/semana, durante sete semanas. Este procedimento foi feito em acelerador linear de 4MeV em campos

englobando região cérvico-facial até 50,4Gy, com proteção medular aos 45Gy, e a seguir duas reduções sobre a lesão primária aos 50,4 e 64Gy. O “boost” final englobou a lesão primária com margens de 1cm (quando N+).

A carboplatina, AUC 1,5 semanal concomitante à radioterapia, ou cetuximabe, 400mg/m² 01 semana antes do início da radioterapia seguido de 250mg/m² semanal concomitante à radioterapia, foram infundidas a partir do cálculo por no máximo sete semanas. A toxicidade hematológica foi monitorada semanalmente, requerendo-se níveis mínimos de neutrófilos > 1,500/mm³, plaquetas > 100,000/mm³; hemoglobina > 9,0g/dl. Para a infusão de quimioterapia foram considerados os níveis de hemoglobina abaixo de 9,0, sendo em alguns casos realizado a sua correção (transusão de concentrado de hemácias, a critério do da equipe médica).

Todos os procedimentos de avaliação prévia ao início do tratamento foram reavaliados num período de quatro semanas após o início do tratamento. Os pacientes foram também reavaliados com exame clínico e nasofaringoscopia, tomografia ou ressonância após duas semanas da última aplicação de dois ciclos de quimioterapia neoadjuvante e na quinta semana após a radioterapia combinada com carboplatina. Os pacientes com resposta parcial < 50%, doença estável ou progressão do tumor foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor após quimioterapia neoadjuvante ou da quinta semana de radioterapia. O esvaziamento supra-omoióideo ampliado para nível IV foi realizado nos casos N0 e N1 submetidos à cirurgia de resgate após insucesso da quimioterapia neoadjuvante ou da radioterapia associada à carboplatina ou ao cetuximabe aos 5040 cGy.

A avaliação durante o tratamento quimio e radioterápico foi baseada na utilização da escala de sintomas do MD Anderson Cancer Center, EUA, e exame físico no intervalo entre quimioterapia neoadjuvante semanalmente. Os exames laboratoriais como hemograma, plaquetas, uréia e creatinina foram feitos no intervalo entre quimioterapia neoadjuvante e semanalmente durante a radioterapia associada à carboplatina ou cetuximabe. O questionário de qualidade de vida foi aplicado ao término da quimioterapia neoadjuvante, após qualquer procedimento cirúrgico e semestralmente após o término do tratamento até completar dois anos, quando passa a ser anual até o quinto ano. O seguimento dos pacientes após o tratamento será mensal nos primeiros seis meses, bimensal por seis meses adicionais, trimestral por dois anos e semestral por dois anos adicionais. As medidas de eficácia

consideradas para a avaliação do tratamento foram a mensuração da doença (lesões uni ou bi-dimensionalmente mensuráveis e lesões avaliáveis não mensuráveis) e a avaliação da resposta ao tratamento (toxicidade e resposta ao tratamento). Em adição, caso houvesse suspeita de progressão da doença antes do término do tratamento neoadjuvante ou numa segunda etapa durante o tratamento com radioterapia e carboplatina ou cetuximabe (até 5040 cGy), foi repetida oroscopia, nasofaringoscopia e/ou tomografia computadorizada ou ressonância magnética conforme indicado pelo médico. A resposta global do paciente é efetuada após o término do tratamento.

Para doença uni ou bidimensionalmente mensurável foram consideradas a resposta completa (desaparecimento da doença clínica ou radiologicamente por endoscopia/biópsias), resposta parcial (nas doenças bidimensionalmente mensuráveis - redução > 50% na soma dos produtos dos diâmetros perpendiculares maiores em todas as lesões, e nas lesões unidimensionalmente mensuráveis). Não é necessária a regressão de todas as lesões para qualificar a resposta parcial, porém nenhuma lesão poderá progredir ou aparecer. No caso de doença estável (nas doenças bidimensionalmente mensuráveis - menores que 25% de diminuição no tamanho da soma dos produtos dos diâmetros perpendiculares, maiores de todas as lesões mensuráveis observadas antes do tratamento; para doença unidimensionalmente mensurável – menores que 50% de redução e menores que 25% de aumento da soma do diâmetro de todas as lesões observadas antes do tratamento e na ausência de novas lesões), doença progressiva (menores que 25% de aumento do tamanho na lesão mensurável em comparação às medidas basais). Para doença não mensurável foram consideradas resposta completa (desaparecimento completo de toda a doença conhecida), resposta parcial (redução estimada do tamanho do tumor em 50%), doença estável (diminuição estimada menor que 50% ou aumento estimado menor que 25%) e doença progressiva (aparecimento de qualquer lesão nova não identificada previamente ou aumento estimado maior que 25% em lesões existentes).

A determinação da resposta patológica foi baseada nos resultados de exames histológicos em biópsias ou peça cirúrgica. Para a determinação da resposta global ao tratamento foram consideradas as respostas nas lesões uni ou bidimensionalmente mensuráveis, resposta em lesões unidimensionalmente mensuráveis e resposta em lesões não mensuráveis. Em adição, no acompanhamento dos pacientes foram considerados os dados referentes à duração da resposta à terapia a partir da data do

início do tratamento até a documentação da progressão de doença, óbito, último contato ou última avaliação do paciente, questionários de qualidade de vida e eventos adversos (qualquer evento indesejável associado à utilização do medicamento, não relacionado ao tratamento, incluindo qualquer efeito colateral, toxicidade ou reações de sensibilidade).

Para quantificação do consumo de tabaco na população, foram considerados pacientes tabagistas aqueles que consumiram mais de 100 cigarros na vida e continuam a consumir ou pararam o consumo por um período inferior à um ano; ex-tabagistas aqueles que fizeram consumo de mais de 100 cigarros na vida e pararam por um período superior a um ano e não tabagistas (negam uso) aqueles que nunca fizeram uso ou consumiram menos de 100 cigarros na vida. Esses parâmetros foram adaptados junto ao corpo clínico do Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer A. C. Camargo e baseados nos relatos de Mok *et al.* (2009).

Critérios similares foram utilizados o consumo de álcool, no qual foram considerados pacientes etilistas aqueles que fazem uso contínuo de bebidas alcoólicas ou pararam por período inferior à um ano; ex-etilistas aqueles que pararam o consumo por um período superior à um ano e não etilistas (negam) aqueles que nunca fizeram uso de bebidas alcoólicas.

As amostras tumorais foram avaliadas para alterações genômicas (CGH-*array*) utilizando a plataforma de 4x180K, análise de expressão gênica global na plataforma de 4x44K (ambas da *Agilent Technologies*), e o padrão de infecção pelo HPV para comparação entre os dados clínico-patológicos e dados de resposta ao tratamento. Os principais dados clínico-patológicos dos pacientes estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resumos dos dados clínicos dos pacientes de carcinoma de orofaringe de tecido à fresco (FAR1T a FAR17T) e amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina do Hospital do Câncer A.C. Camargo e amostras do Hospital do Câncer de Barretos (O-01 a O-14), ordenadas de acordo com a droga associada à radioterapia (RT).

Amostras obtidas no Hospital AC Camargo, SP														
Amostra	Sítio Específico	Idade	Sexo	História familiar	Tabagista	Etilista	Data da Cirurgia	Óbito	Metástase	EC	T	N	M	RT
FAR1T	Tonsila	50	Masculino	Avó paterna Ca pulmão	Sim	Não	02.04.2004 (Ressecção)	20.11.2009	Fígado	IV	4	0	0	Carboplatina
FAR2T	Base de língua (*)	50	Masculino	Irmã Ca mama (50 anos)	Não	Sim	29.03.2008 (Biópsia)	Não	Não	IV	4	2b	0	Carboplatina
FAR3T	Base de língua	62	Masculino	Nega	Sim	Sim	25.05.2009 (Biópsia)	16.01.2010	Pulmonar e Hepática	IV	4	3	0	Carboplatina
FAR6T	Tonsila	39	Masculino	Nega	Sim	Sim	25.02.2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	3	2a	0	Carboplatina
FAR7T	Base de língua	40	Masculino	ND	Sim	Sim	17.03.2010 (Biópsia)	Não	ND	IV	4	2b	0	Carboplatina
FAR8T	Tonsila	46	Masculino	Irmão Ca língua/ irmão Ca pele	Sim	Sim	22.03.2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	2	2a	0	Carboplatina
FAR9T	Tonsila	48	Masculino	Tia paterna Ca mama/ Irmã Linfoma de Hodgkin/ Avô materno ca próstata	Sim	Não	21.06.2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	2	3	0	Carboplatina
FAR10T	Tonsila	44	Masculino	Avô Ca indeterminado	Sim	Sim	26.04.2010 (Biópsia)	Não	Não	III	3	0	0	Carboplatina
FAR11T	Tonsila	50	Masculino	Nega	Não	Não	04.07.2010 (Biópsia)	Não	ND	III	3	1	0	Carboplatina
FAR12T	Tonsila	65	Masculino	Irmã Ca mama (30 anos)	Não	Sim	06.07.2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	3	2b	0	Carboplatina
FAR17T	Tonsila	55	Masculino	Nega	Sim	Sim	01.11.2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	3	3	0	Carboplatina
1025827	Tonsila	47	Masculino	Irmã ca de mama, mãe ca tireóide, pai ca próstata	Sim	Sim	27/08/2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	4a	2c	0	Carboplatina
1025726	Base de língua	70	Masculino	Irmã neo de pulmão, irmão neo de garganta, intestino	Ex	Sim	27/08/2010 (Biópsia)	Não	SNC, pulmão e local	IV	3	1	0	Carboplatina
O-01	Base de língua (*)	55	Masculino	Sobrinho Ca indeterminado	Sim	Não	23.04.2010 (Biópsia)	Não	Não	IVa	4	2b	0	Carboplatina

O-02	Base de língua (*)	61	Masculino	Nega	Sim	Sim	17.03.2010 (Biópsia)	Não	Não	IVa	4a	1	o	Carboplatina
O-04	Tonsila (*)	56	Masculino	Nega	Sim	Sim	15.03.2010 (Biópsia)	Não	Não	III	3	o	o	Carboplatina
O-07	Base de língua (*)	68	Masculino	Nega	Sim	Sim	05.04.2010 (Biópsia)	Não	Não	III	3	1	o	Carboplatina
O-08	Tonsila	51	Masculino	Nega	Sim	Sim	18.06.2010 (Biópsia)	Não	Não	IVb	3	3	o	Carboplatina
O-10	Palato mole (*)	48	Masculino	Pai Ca pulmão/Irmão Ca garganta	Sim	Sim	04.03.2010 (Biópsia)	Não	Não	Iva	4a	1	o	Carboplatina
O-12	Tonsila	39	Masculino	Nega	Não	Não	17.07.2010 (Biópsia)	22.01.2011	Não	IV	4	o	o	Carboplatina
O-13	Tonsila	71	Masculino	Mãe - Ca Gástrico	Não	Não	29.07.2010 (Biópsia)	Não	Não	III	2	1	o	Carboplatina
O-14	Palato mole	66	Masculino	Nega	Sim	Sim	12.08.2010 (Biópsia)	Não	Não	IVa	3	2c	o	Carboplatina
1009242	Seio piriforme (*)	57	Masculino	Tia materna adenoma gástrico e cdi mama, avó ca estômago	Sim	Sim	12/03/2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	3	3	o	Cisplatina
FAR4T	Base de língua	51	Masculino	Pai Ca próstata/ mãe Ca pâncreas/ irmão Ca garganta/ Tio Ca nariz e garganta	Sim	Sim	31.10.2009 (Biópsia)	Não	Não	IV	4c	1	o	Cetuximabe
FAR15T	Base de língua	70	Masculino	Nega	Sim	Sim	19.11.2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	3	2a	o	Cetuximabe
1023767	Palato mole	54	Feminino	Pai Ca coluna cervical,Irmão Ca esôfago, Tios paternos Ca	Sim	Sim	11/08/2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	4a	2b	o	Cetuximabe
1001633	Base de língua	66	Masculino	Irmão e filho com plaquetopenia	Ex	Nega	12/01/2010 (linfadenectomia)	Não	Não	IV	4a	1	o	Cetuximabe
1102747	Tonsila	67	Masculino	Nega	Sim	Nega	27/01/2011 (cirurgia)	Não	Linfonodo	IV	3	2b	o	Cetuximabe
937501	Palato mole (*)	70	Masculino	Nega	Sim	Sim	16/09/2009	25.06.2010	Pulmões	IV	3	2a	o	Cetuximabe
837868	Seio piriforme	48	Masculino	Tios e primos ca garganta, boca e estômago	Sim	Sim	16/10/2009 (Biópsia)	02.03.2011	Pulmão, fígado, lnd mediastinal	IV	3	2b	o	Cetuximabe
FAR5T	Base de língua	71	Masculino	Pai Ca estômago / Irmão Ca próstata/ Tios e primos Ca de estômago	Não	Sim	05.02.2010 (Biópsia)	21.12.2010	Não	IV	3	2c	o	Sem seguimento

1000030	Palato mole (*)	60	Masculino	Pai ca garganta, mãe ca ovário	Sim	Nega	06/01/2010 (ressecção da lesão)	Não	Não	I	1	o	o	Não fez RT
1013417	Base de língua	48	Masculino	Nega	Sim	Nega	05/05/2010 (cirurgia-ressecção ampla)	Não	Não	II	2	o	o	Não fez RT
1026835	Seio piriforme (*)	64	Masculino	Primo óbito ca gástrico	Nega	Sim	06/09/2010 (Biópsia)	Não	Não	III	3	o	o	Não fez RT
1039532	Base de língua	50	Masculino	Irmã ca tireóide, mãe ca ovário, avó materna ca, prima materna ca mama, tia-avó ca SNC	Ex	Nega	29/12/2010 (Biópsia)	Não	Não	IV	3-4	2b	o	Não fez RT (Inicial)
O-05	Tonsila	44	Masculino	Nega	Sim	Sim	17.02.2010 (Biópsia)	03.03.2010	Não	IVa	3	3	o	Não fez RT (Óbito)
O-11	Tonsila	61	Masculino	Nega	Sim	Ex	30.06.2010 (Biópsia)	Não	Não	III	3	o	o	Não fez RT

ND: Informação não disponível; **Ca:** Câncer; **(*):** CE de orofaringe com extensão local, nasofaríngea ou hipofaríngea; **EC:** Estádio clínico; **T:** Tumor, **N:** Comprometimento de linfonodos, **M:** Metástase; **RT +:** Radioterapia associada à Carboplatina ou Cetuximabe.

3. Extração de DNA total tumoral

Foi obtido DNA de 25 casos de tecido a fresco de carcinomas de orofaringe. O isolamento do DNA foi realizado com a adição de Proteinase K (10mg/mL – *USB corporation*) para digestão enzimática, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 - *Invitrogen*) para extração de ácidos graxos e precipitação com etanol 100% gelado. Após a extração do DNA, as amostras foram tratadas com RNase A do kit *MasterPure Complete DNA and RNA Purification (Epicentre Biotechnologies)* de acordo com as especificações do fabricante. Os ácidos nucléicos dos tecidos a fresco provenientes do Hospital A.C. Camargo foram obtidos do Banco de Biomoléculas dessa Instituição, sob a responsabilidade da Dra. Dirce Maria Carraro.

Os tumores fixados em formalina e em blocos de parafina (12 casos) foram obtidas por procedimento perfuração das áreas tumorais utilizando-se agulhas especiais confeccionadas com o auxílio de uma microretífica. O bisel foi retirado para se formar uma extremidade reta e uma “janela” foi aberta na lateral da agulha a aproximadamente 1-2mm de sua extremidade. As regiões contendo células tumorais na biópsia foram demarcadas após o preparo de lâminas coradas com hematoxilina e eosina pela patologista responsável (Dra. Renee Laufer Amorim). Posteriormente, o bloco de tecido congelado foi microdissecado com o auxílio destas agulhas e o tecido tumoral foi processado para obtenção de DNA. O tecido foi tratado com solução de Tween 20, 10%, PBS 1x, Etanol 100% e Tiocianato de Sódio (NaSCN). Para posterior extração do DNA genômico seguiu-se o protocolo proposto por Bees *et al.* (2006) utilizando o kit *Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade*) seguindo os parâmetros de pureza e qualidade sugeridos pelo fabricante.

4. Genotipagem de HPV

A genotipagem do HPV foi realizada nos 37 casos utilizando o teste *LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche, Branchburg, USA)*, que se baseia na amplificação do DNA alvo por PCR utilizando iniciadores para 37 subtipos de HPV. A hibridação dos produtos amplificados foi realizada com sondas de oligonucleotídeos e a detecção dos produtos amplificados e ligados às sondas foi realizada por determinação colorimétrica, de acordo com as recomendações do fabricante. A

amplificação de um grande espectro de genótipos do HPV, incluindo 13 genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), utiliza iniciadores biotinilados em uma região polimórfica conservada entre os diferentes genótipos de HPV. O controle de qualidade do DNA inclui um conjunto de iniciadores para o gene da β -globina humana (268pb). Após a amplificação foi acrescida ao produto amplificado uma solução de desnaturação, tornando as cadeias dos amplicons de fita simples para ser hibridada por complementariedade na tira de genotipagem, a qual é revestida com sondas para os 37 subtipos de HPV e β -globina. Foram realizados os procedimentos de hibridação, lavagem e detecção de acordo com as especificações do fabricante e o resultado foi interpretado com o auxílio do Guia de Referência do Teste de Genotipagem *LINEAR ARRAY HPV*.

5. Avaliação da variação no número de cópias genômicas por CGH-array

As amostras de DNA genômico (gDNA) de 32 carcinomas de orofaringe foram avaliadas pela metodologia de CGH-array. Foram utilizados dois tipos de marcação diferencial, de acordo com a integridade das amostras de DNA genômico. Nos casos que apresentaram uma banda genômica seguida de um rastro foi utilizado o procedimento de marcação covalente pelo *Genomic DNA ULS (Universal Linkage System) labeling kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O DNA genômico comercial masculino (Promega) foi utilizado como referência, variando apenas o grau de fragmentação do DNA pela temperatura (95°C durante 10, 15 ou 20min, de acordo com a intensidade e integridade da banda de DNA genômico da amostra alvo), devendo estar o gDNA alvo e controle entre 500pb e 2kb. Os dados de variações no número de cópias genômicas foram gerados utilizando-se a plataforma *Human Genome CGH Microarray 4x180K* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Neste protocolo utilizou-se 500ng de gDNA em um volume máximo de 8,0 μ L. Tanto o gDNA teste quanto o referência foram fragmentados a 95°C em um termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) por tempo variado de acordo com o a integridade do gDNA e deixadas em gelo por 5 min. O tempo de fragmentação foi determinado de acordo com o padrão da banda em gel de agarose 0,8%. Para a marcação foi adicionado 0,5 μ L de H₂O Milli-Q, 1 μ L de *Labeling solution* e 0,5 μ L de ULS-Cy3 (tumor) ou Cy5 (referência). A reação foi incubada no termociclador PTC-100 a 85°C por 30 min e mantida em gelo por 5 min. Para obter

um volume de 20 uL final, foi adicionado 10uL de H₂O Milli-Q e realizada a purificação para exclusão das cianinas não incorporadas ao gDNA. Esse procedimento foi realizado utilizando-se *KREA pure Column* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) por ressuspensão em vórtex, liquefazendo o tampão e a resina. Em seguida, as colunas foram colocadas em tubo coletor e centrifugadas a 16000g por 1 min. O tampão obtido com a centrifugação foi descartado e em seguida foi adicionado 300uL de H₂O Milli-Q às colunas. Depois de uma nova centrifugação (16000g por 2 min), as colunas foram colocadas em um novo tubo de 1,5mL. O volume de 20µL do gDNA foi colocado na coluna, seguida de centrifugação a 16000g por 1 min. A quantificação do gDNA marcado foi realizada com o objetivo de calcular a eficiência da reação de marcação. A hibridação das amostras foi realizada de acordo com os valores de eficiência recomendados pelo fabricante. As amostras de casos e referência foram analisados e combinados de acordo com a semelhança nos valores de eficiência de incorporação das cianinas. A preparação do gDNA marcado para a hibridização consistiu na adição de 55µL de *2X Hi-RPM Hybridization Buffer*, 1µL de *100X Blocking Agent* e 5µL de *Human Cot-1*. Essa reação foi incubada no termociclador a 95°C por 3 min e, posteriormente, incubada a 37°C por 30 min, seguido da adição de 27uL de *Agilent-CGH Block*.

Para as amostras que apresentaram um uma única banda de DNA genômico, em gel de agarose 0,8%, foi utilizada a metodologia de marcação enzimática. Para realização dos experimentos foram utilizados 500ng de cada amostra para um volume final de 20,2µL. As amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,0µL de H₂O Milli-Q, 2,6µL de Buffer C, 0,2µL de BSA e 0,5µL das enzimas *Alu I* e *Rsa I* (Prodimol), totalizando 26µL. As reações foram incubadas a 37°C por diferentes tempos de digestão (de acordo com a banda de DNA genômico), variando de 1 a 2h e 65°C por 10min, e mantidas em gelo durante o procedimento. Para a reação de marcação foi utilizado o Kit *Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling* (Agilent Technologies), de acordo com especificações do fabricante. Em resumo, foram adicionados 5µL de iniciadores randômicos e as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3min e transferidas para o gelo. A marcação foi realizada com a adição de 10µL de Buffer, 5µL do dNTP mix, 1µL da enzima *Exo-Klenow* e 1,5µL de Cy3 e Cy5 dCTPs (Agilent Technologies) às amostras tumorais e referência, respectivamente. Como DNA referência foi utilizado o DNA genômico comercial masculino (Promega). As amostras foram incubadas a 37°C por 2h (com

exceção das amostras de parafina, que foram marcadas por 3h) e 65°C por 10min e mantidas em gelo. A purificação foi realizada em mini-colunas de celulose (Microcon YM-30, Millipore) de acordo com instruções do fabricante e eluídas em TE (tampão Tris-EDTA) 1x pH8.0 (Prodimol). O volume final da reação é de 21µL. Após a combinação das amostras tumorais e de referência, a hibridização foi realizada por meio da adição de 55µL de *2X Hi-RPM Hybridization Buffer*, 11µL de *10X Blocking Agent* e 5µL de *Human Cot-1*. Essa reação foi incubada no termociclador a 95°C por 3 min e, posteriormente, incubada a 37°C por 30 min.

O volume final de 100µL foi aplicado à lâmina 4x180K, a qual foi acondicionada em um forno de hibridização (Agilent G2545A) a 20rpm por 24 horas a 65°C. A captura das imagens foi realizada usando o *Microarray Scanner System* (Agilent G2565CA), por meio do *Scan Control Software* 8.1 e a extração dos dados foi realizada usando o *Software Feature Extraction* v10.7 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Após a extração dos dados foram avaliados os critérios de qualidade (QC Metrics) recomendados pelo fabricante.

6. Análise dos dados de CGH-array

Após a análise de controle de qualidade, verificou-se o padrão de hibridação das lâminas e a análise dos dados pelo software *Nexus Copy Number software 5.0* – aCGH. O algoritmo estatístico utilizado na análise tanto do grupo amostral foi *FASST Segmentation*, que utiliza como parâmetro para detecção inicial de alterações genômicas o limiar de sensibilidade (*threshold*) $1,0 \times 10^{-6}$, espaçamento entre as sondas de 1000bp e a presença de, no mínimo, 3 sondas consecutivas alteradas. Foram consideradas sondas alteradas as que apresentavam valores de \log_2 (0,2-0,6) para ganhos; (>0,6) ganho de mais de duas cópias; (-0,2) perda heterozigota e (-1,25) perdas homozigotas ou deleção, com 3% de sondas *outliers* como controle de qualidade, *p-valor* de 0,05 e alterações presentes em pelo menos 20% dos casos.

Após a ativação dos filtros, foi gerada uma tabela para cada amostra com suas respectivas alterações. As regiões identificadas como alteradas, ou seja, envolvidas em ganhos ou perdas, foram comparadas com o banco de dados de CNVs derivado de uma análise de CGH-array em 82 mulheres brasileiras saudáveis, (utilizando a mesma plataforma de estudo) e com o banco público de dados *Database of Genomic Variants* (DGV 18 – <http://projects.tcag.ca/variation/>).

Alterações presentes em mais que 5% desses controles normais foram excluídas da análise. Isto porque 80% das diferenças no número de cópias entre pares de indivíduos ocorrem devido a CNVs comuns com uma frequência alélica > 5% (McCarroll *et al.* 2008). As CNVs detectadas também foram comparadas com o *Database of Genomic Variants* (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>)

7. Extração de RNA tumoral

Em 22 casos foi possível obter RNA dos carcinoma de orofaringe utilizando-se o *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação e a qualidade do RNA foram avaliados utilizando-se o *NanoDrop* (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) e o *Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100 Agilent)*, respectivamente.

8. Expressão gênica global

O perfil de expressão gênica global foi avaliado utilizando-se a plataforma *Whole Human Genome 4x44K* (Agilent Technologies). Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis* (Agilent Technologies) que utiliza o *Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies) recomendado pelo fornecedor. Para a pré-síntese de cDNA foram obtidos 800ug de RNA total das amostras teste e RNA de Referência Universal, que foram marcadas com cianina 3 (Cy-3) e cianina 5 (Cy-5), respectivamente. O RNA de referência universal utilizado contém uma mistura de quantidades iguais de RNA total obtido de 15 diferentes linhagens celulares (Tabela 4). Este RNA universal já foi utilizado em vários estudos (Gomes *et al.*, 2005; Stolf *et al.*, 2006; Boccardo *et al.*, 2010).

Foram utilizadas quatro amostras de tonsila como referência normal obtidas de pacientes que foram submetidos a tonsilectomia por indicação médica (os pacientes autorizaram a utilização de suas amostras por Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Igualmente, foram obtidos tecidos normais adjacentes de tumores na tonsila palatina (duas amostras) e de base de língua (três amostras) para comparação entre os tecidos tumorais e tecidos normais. Estes casos foram agrupados por sítio específico.

Tabela 4. Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA de referência universal.

Linhagens celulares	Origem
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDu	Carcinoma Epidermóide de Faringe
GM 637	Fibroblasto
H 146	Carcinoma de Pulmão
H 1080	Fibrossarcoma
HB4 alfa	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Rim embrionário Humano
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-28	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

A quantidade relativa de cada mRNA na amostra foi calculada como a razão entre a intensidade na amostra sobre a intensidade na referência; e as amostras foram comparadas entre si pela razão das razões (Pollack, 2002).

Foram adicionados 2µL de RNA *spike A* às amostras teste e 2µL de RNA *spike B* às amostras referência, além de 1,2µL de T7 *Promoter Primer*, o qual se liga à cauda poli-A do mRNA. Essa reação foi incubada no termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) por 10 min a 65°C e colocada em gelo por 5 min. A síntese de cDNA consistiu na adição de 4µL de 5X *First Strand Buffer* (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2µL de DTT (0.1M), 1µL de dNTP mix (10mM), 0,5µL da enzima *RNaseOut*, que promove a inativação das RNases e 1µL da enzima MMLV-RT, responsável pelo início da transcrição reversa. As reações foram incubadas em termociclador por 2 horas a 40°C, para realizar a transcrição reversa, e a 65°C por 15 min, para inativar a ação da enzima, e foram transferidas para o gelo. As amostras de cDNA foram transcritas para cRNA em um

volume final de 80µL por reação contendo 15,3µL de água estéril, 20µL de 4X *Transcription Buffer*, 6,4µL de 50% PEG, 6µL de DDT (0.1M), 8 µL de NTP mix, 0,5 µL de *RNaseOUT*, 0,6 µL de *Inorganic Pyrophosphatase*, 2,4 µL de Cy-3 ou Cy-5 e 0,8 µL da enzima T7 RNA Polimerase, que incorpora as cianinas à fita de cRNA. As reações permaneceram em termociclador a 40°C por 2 horas. A purificação das sondas foi realizada utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Quiagen). Após as etapas de purificação na coluna, o cRNA purificado foi coletado em 30µL de água estéril. Os procedimentos de hibridação e lavagem seguiram as recomendações do fabricante. A captura das imagens foi obtida após o uso do *DNA microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology* (Agilent Technologies) e o *Scan Control Software 8.1*. A extração dos dados foi possível usando o *Software Feature Extraction v10.7* (Agilent Technologies). Este programa além de extrair os valores de intensidade a partir das imagens geradas, também possibilita a aplicação de testes de qualidade das hibridações utilizando os *RNAs spike* adicionados durante a marcação. Este procedimento também faz as correções necessárias dos valores de intensidade provenientes de cada corante (usando o algoritmo *Lowess*), para eliminar as diferenças de eficiência da emissão dos corantes fluorescentes Cy-3 e Cy-5 assim como a subtração do *background* local (valor de intensidade de fluorescência ao redor de cada *spot*).

9. Análise dos dados de expressão gênica global

A análise da qualidade das hibridações foi realizada utilizando os relatórios *QC Reports* gerados pelo *Software Feature Extraction v10.7* (Agilent Technologies). Foi analisado um conjunto de 15.504 sondas de cDNA presentes nas matrizes 44K, com medidas válidas (determinadas a partir do conjunto de controles negativos representados na plataforma).

O software R 2.9.2 (*R Development Core Team, 2009*) foi utilizado para cálculo da média entre as sondas que cobrem um mesmo gene e remoção dos controles e genes que apresentaram um número de Nas (*not applied*, na ausência de sinal) igual a zero para o grupo normal e menor ou igual a 10 para o grupo tumoral permitindo assim a formação de uma única matriz de dados em log na base 2. Para a análise dos dados de expressão gênica foi utilizado o programa *TMeV version 4.5* (<http://www.tm4.org>), o qual permite aplicar testes estatísticos paramétricos (teste

t) para identificar genes diferencialmente expressos entre o tumor e o tecido normal. Após a remoção de *outliers* pouco reprodutíveis entre as réplicas, utilizou-se a ferramenta *Significance Analysis for Microarray* (SAM). Esta análise permite a identificação de genes diferencialmente expressos com significância estatística entre conjuntos de experimentos de *microarrays*, por permutações repetidas dos casos de expressão de cada transcrito, entre as amostras de dois ou mais grupos que estão sendo comparados. Para cada gene, o valor real da correlação medida entre os grupos (valor observado) é comparado a um valor de correlação obtido pela permutação dos dados (valor esperado ao acaso) para checar o valor estatístico associado ao conjunto de transcritos encontrados como diferencialmente expressos entre duas condições analisadas.

Se o valor de correlação observado exceder o valor esperado, a diferença de expressão é considerada significativa. Para isso foi utilizado um P-valor < 0.05. O programa também permite o cálculo da taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rate* - FDR), que expressa a porcentagem de falsos-positivos dentro do grupo de transcritos considerado diferencialmente expresso. Para a seleção de um conjunto de transcritos foi considerada uma taxa de falso positivo de 5% entre os dados presentes nos grupos tumorais.

Após a identificação de um conjunto de transcritos diferencialmente expressos, foram feitas análises de agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical Clustering Analysis* - HCL) utilizando o programa TMEV e como medida de similaridade foi utilizada a distância Euclidiana e 1000 permutações. Foram construídos mapas de expressão (*Heat Maps*) dos transcritos diferencialmente expressos utilizando-se o mesmo programa. Outro método utilizado para a obtenção de significância estatística das diferenças de expressão (valores de *P*) foi calculado por *bootstrap resampling*, ou seja, análise dos valores dos genes significantes expressos após 1000 permutações aleatórias das amostras (Reis *et al.*, 2004).

Todos os genes com alteração de expressão gênica tiveram o *fold change* calculado e foram classificados em grupos utilizando as anotações das vias do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*-KEGG e a base de dados *Gene Ontology* (GO). Os genes com *fold change* significativo foram submetidos à análise de redes, vias gênicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular com a utilização do

software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems). Os scores para cada item foram calculados pelo teste exato de Fischer e são iguais a $-\log(\text{valor de } P)$.

10. Análise integrada entre dados de CGH-array e expressão gênica

Para a realização da análise integrada, foram selecionados os dados da $\log_2\text{Ratio}$ obtidos da análise de CGH-array (genômicos) e de expressão gênica (transcriptômicos). As 22 amostras submetidas à análise de expressão gênica e previamente avaliadas por CGH-array foram selecionadas para a análise integrada.

Para análise de integração dos dados, a ferramenta JISTIC (Sanchez-Garcia *et al.*, 2010) foi inicialmente aplicada nos dados genômicos para a identificação de regiões aberrantes mais prováveis de estarem associadas com o tumor. Em resumo, este algoritmo é baseado no GISTIC (Beroukhim *et al.*, 2007) que utiliza um método estatístico (*G-score*) que representa o tamanho da alteração cromossômica para cada marcador, onde o *G-score* é a somatória do número de cópias de cada marcador entre as amostras. O JISTIC é superior ao GISTIC por permitir a distinção entre CNVs “*passengers*” (ou seja, alterações não relacionadas ao desenvolvimento tumoral) das CNVs “*drivers*”, que possuem associação direta com o fenótipo e desenvolvimento tumoral (Parmigiani *et al.*, 2009). A aplicação deste algoritmo é baseada na fórmula representada abaixo:

$$\sum_i G_n(m,i) = G_n(m) > G_{thres}$$

Após a obtenção das CNVs “*drivers*” pelo JISTIC, os dados foram comparados aos dados do perfil de expressão gênica utilizando a correlação de *Pearson* (Jönsson *et al.*, 2010). Os coeficientes de correlação de *Pearson* (ρ) obtidos para cada gene variaram de [-1 a 1], onde [-1] indica correlação negativa perfeita, [0] relaciona-se à ausência de linearidade na dependência entre as duas variáveis e [1] indica correlação positiva perfeita. Genes com $0 < \rho \leq 1$ foram submetidos à análise funcional.

Os genes cujos dados de CGH-array e expressão gênica não foram concordantes (ganho/diminuição de expressão ou perda/aumento de expressão)

foram avaliados quanto à regulação por miRNAs com a utilização de duas ferramentas de predição de alvos biológicos de miRNAs: *Target Scan* (<http://www.targetscan.org/>) e *miRecords* (<http://mirecords.biolead.org/>). Os miRNAs detectados foram comparados às regiões com variação no número de cópias descritos após análise de CGH-array.

11. Análise funcional

Os genes significantes obtidos a partir da análise integrada ($0 < \rho \leq 1$) foram submetidos à análises funcionais utilizando o *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (*Ingenuity® Systems*, <http://www.ingenuity.com>). Abaixo, está apresentada a descrição de cada etapa das análises funcionais:

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

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

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

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

Resultados

RESULTADOS

1. Dados clínico-patológicos da casuística

Os dados clínicos e histopatológicos dos 37 casos de carcinomas de orofaringe foram analisados e atualizados em maio de 2011 com o objetivo de associar estes dados com os resultados moleculares do estudo. A tabela 5 resume estes achados.

Dentre os carcinomas de orofaringe analisados, 25 amostras (67,6%) eram de tecido a fresco e 12 (32,4%) de tecido fixado em formalina e em blocos de parafina (FFEP). A idade dos pacientes variou de 39 a 71 anos, com mediana de 55 anos, sendo a predominância de pacientes do sexo masculino (97%). O sítio anatômico de prevalência foi a tonsila palatina (41%) seguido da base de língua (com ou sem extensão para áreas adjacentes - 35%). A maioria dos pacientes (59%) fazia uso de tabaco ou álcool e 43% fazia uso concomitante destes dois agentes. A história de câncer na família foi relatada em 54% dos pacientes. O seguimento clínico variou de 2 a 69 meses.

2. Resposta clínica ao tratamento proposto

Foram considerados os dados referentes à duração da resposta à terapia após o segundo ciclo da quimioterapia neoadjuvante de docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracil (TPF) - QT de indução (resposta inicial) para todos os pacientes inclusos no estudo. Para a análise de resposta final foram utilizados somente os casos que receberam, após o término da QT de indução, radioterapia associada à carboplatina, totalizando 22 casos para a análise de CGH-*array* e 17 casos para a análise de expressão gênica global e análise integrada dos dados. O resultado final de resposta foi dado com a documentação da progressão de doença, óbito, último contato ou última avaliação do paciente, considerando os eventos adversos que surgiram no decorrer do tratamento.

A tabela 6 apresenta os dados de resposta a tratamento caso a caso, bem como características clínicas e patológicas relevantes, além das análises às quais os casos foram submetidos. Nem todos os pacientes concluíram o tratamento devido à característica prospectiva do projeto, ou por não apresentarem condições clínicas para serem submetidos à RT, ou ainda por motivo de falecimento durante o

tratamento. Para os casos que concluíram pelo menos uma etapa do tratamento, foi considerada resposta completa (RC) o desaparecimento de toda a doença conhecida, determinada por duas observações em um intervalo de quatro semanas ou mais; Resposta parcial (RP) quando ocorria a diminuição de pelo menos 25% da lesão, determinada por duas observações em um intervalo de quatro semanas ou mais; Doença estável (DE) quando houve diminuição inferior a 25%, assim como aumento inferior 25% da lesão; Doença progressiva (DP) quando ocorreu o aumento superior a 25% do tamanho da lesão, assim como a ocorrência de derrame pleural, ascite, ou metástase cerebral, sendo categorizada após seis semanas da entrada no estudo e “ND” (não determinado) quando os pacientes que realizaram o tratamento fora das instituições vinculadas e foi perdido o seguimento ou quando ainda não foi estipulada a resposta devido à precocidade do tratamento (Miller *et al.*, 1981).

Tabela 5. Distribuição da casuística segundo as variáveis clínico-patológicas e demográficas dos 37 pacientes com carcinoma de orofaringe avaliados no presente estudo.

Variável	Nº Pacientes (%)	Mediana e DP (mínimo e máximo)
Idade (anos)		55 ± 9,9 (39 a 71 anos)
Pacientes		
Tecido a fresco	25 (67,6)	
Tecido FFEP	12 (32,4)	
Gênero		
Masculino	36 (97,3)	
Feminino	1 (2,7)	
História familiar		
Sim	20 (54,1)	
Não	15 (40,5)	
ND	2 (5,4)	
Sítio		
Tonsila palatina	16 (43,2)	(*) 1 caso
Base de língua	13 (35,1)	(*) 4 casos
Seio piriforme	3 (8,1)	(*) 2 casos
Palato mole	5 (13,6)	(*) 3 casos
Tabaco		
Sim	22 (59,5)	
Não	7 (18,9)	
Ex-tabagista	8 (21,6)	
Álcool		
Sim	22 (59,5)	
Não	10 (27,0)	
Ex-etilista	5 (13,5)	
Tabaco e Álcool		
Sim	16 (43,2)	
Não	3 (8,1)	
Tratamento (**)		
Carboplatina	23 (62,2)	
Cetuximabe	7 (18,9)	
Não fez	7 (18,9)	
Recorrência		
Sim	7 (18,9)	
Não	30 (81,1)	
Sobrevida (meses)		10 ± 11,7 (2 a 69 meses)

DP: Desvio padrão; **FFEP:** tecido fixado em formalina e em blocos de parafina; **ND:** Não disponível; **(*):** Casos com extensão para áreas adjacentes; **(**):** Quimioterapia neoadjuvante pelo uso de docetaxel, cisplatina e 5-fluoro-uracil seguido do uso de RT associada a carboplatina ou cetuximabe.

3. Genotipagem de HPV

A genotipagem de HPV foi realizada em todas as amostras incluídas no estudo utilizando o kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche). O subtipo HPV16 foi o mais prevalente entre eles (8/37), seguido do subtipo 18 (2/37), sendo um caso positivo para HPV16/HPV18. Além disso, dois casos apresentaram o subtipo de baixo grau HPV26. Assim, mais de 35% dos casos foram positivos para a infecção (Figura 1; Tabela 6). A prevalência dos casos positivos foi significativamente maior entre os pacientes coletados no Hospital do Câncer A.C. Camargo, comparados com o Hospital do Câncer de Barretos ($P=0,0032$; Teste exato de *Fisher*) (Figura 2).

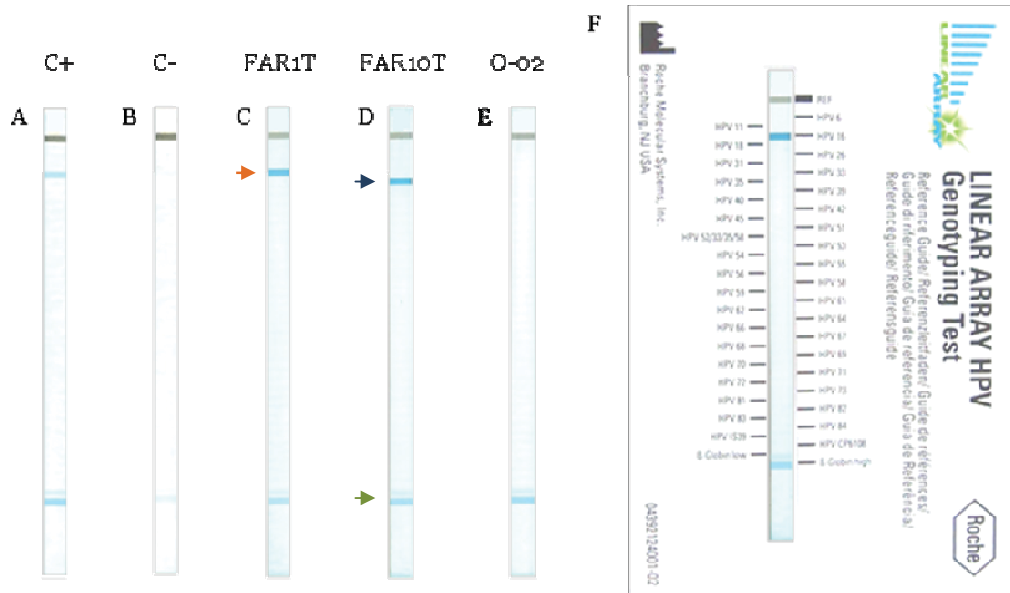


Figura 1. Genotipagem do HPV usando o sistema *LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test* (Roche). A seta laranja indica o genótipo HPV16, azul o HPV18 e o verde indica as bandas correspondentes ao gene da β-globina. (A) Controle positivo contendo positividade para o HPV16 e β-globina; (B) Controle negativo (apenas marcação para a β-globina); (C) Amostra de orofaringe HPV16; (D) Amostra de orofaringe HPV18. (E) Amostra de orofaringe negativa para a presença de HPV e (F) Guia de referência para interpretação dos resultados obtidos nas tiras de genotipagem.

Tabela 6. Padrão de resposta a tratamento, infecção por HPV e dados clínicos relevantes dos pacientes com carcinoma de orofaringe e as análises efetuadas em cada caso.

Casos	HPV	aCGH	GE	Resposta	Tabaco	Álcool	Idade	Sítio Específico
FAR 1T	+16	+	+	Completa	Ex	Nega	50	Tonsila Palatina
FAR 2T	+16	+	+	Completa	Nega	Sim	50	Base de língua (*)
FAR 3T	-	+	-	Progressiva	Sim	Sim	62	Base de língua
FAR 4T	-	+	+	Completa	Sim	Sim	51	Base de língua
FAR 5T	+16	+	+	Sem seguimento	Ex	Sim	71	Base de língua
FAR 6T	+16	+	+	Completa	Sim	Sim	39	Tonsila Palatina
FAR 7T	+16	+	+	Parcial	Nega	Sim	40	Base de língua
FAR 8T	+16	+	+	Completa	Sim	Sim	46	Tonsila Palatina
FAR 9T	+16	+	+	Completa	Ex	Nega	48	Tonsila Palatina
FAR10T	+18	+	+	Completa	Sim	Sim	44	Tonsila Palatina
FAR11T	+18	+	-	Completa	Nega	Nega	50	Tonsila Palatina
FAR12T	+16/+18	+	+	Completa	Nega	Ex	65	Tonsila Palatina
FAR15T	-	+	+	ND (inicial)	Ex	Ex	70	Base de língua
FAR17T	-	+	+	Progressiva	Sim	Sim	55	Tonsila Palatina
O_01	-	+	+	Completa	Sim	Ex	55	Base de língua (*)
O_02	-	+	+	Parcial	Sim	Ex	61	Base de língua (*)
O_04	-	+	+	Completa	Ex	Sim	56	Tonsila Palatina (*)
O_05	-	+	+	Não QT/RT (óbito)	Sim	Sim	44	Tonsila Palatina
O_07	-	+	+	Completa	Sim	Sim	68	Base de língua (*)
O_08	-	+	+	Parcial	Sim	Sim	51	Tonsila Palatina
O_10	-	+	+	Parcial	Sim	Sim	48	Palato mole (*)
O_11	-	+	+	Não fez	Sim	Ex	61	Tonsila Palatina
O_12	-	+	+	Progressiva	Nega	Nega	39	Tonsila Palatina
O_13	-	+	+	Completa	Nega	Nega	71	Tonsila Palatina
O_14	-	+	-	Parcial	Sim	Sim	66	Palato mole
837868	-	-	-	Progressiva	Sim	Sim	48	Seio piriforme
937501	-	-	-	Progressiva	Sim	Sim	70	Palato mole (*)
1000030	-	-	-	Nao QT/RT	Sim	Nega	60	Palato mole (*)
1013417	-	+	-	Nao QT/RT	Sim	Nega	48	Base de língua
1026835	-	+	-	ND	Nega	Sim	64	Seio piriforme (*)
1023767	-	+	-	ND	Sim	Sim	54	Palato mole
1025827	-	+	-	Completa	Sim	Sim	47	Tonsila Palatina
1025726	-	+	-	Parcial	Ex	Sim	70	Base de língua
1001633	+26	-	-	Completa	Ex	Nega	66	Base de língua
1039532	+26	+	-	Parcial	Ex	Nega	50	Base de língua
1102747	+16	+	-	Não QT/RT	Sim	Nega	67	Tonsila Palatina
1009242	-	-	-	Progressiva	Sim	Sim	57	Seio piriforme (*)

HPV: Papilomavírus Humano; **KPS:** Índice de Karnofsky para *Performance Status*; **aCGH:** CGH-array; **GE:** Expressão gênica; **+**: Teste realizado e **-**: não realizado ou negativo para HPV; **ND:** Não disponível; **QT:** Quimioterapia; **RT:** Radioterapia; **(*)**: CEC de orofaringe com extensão local, nasofaríngea ou hipofaríngea.

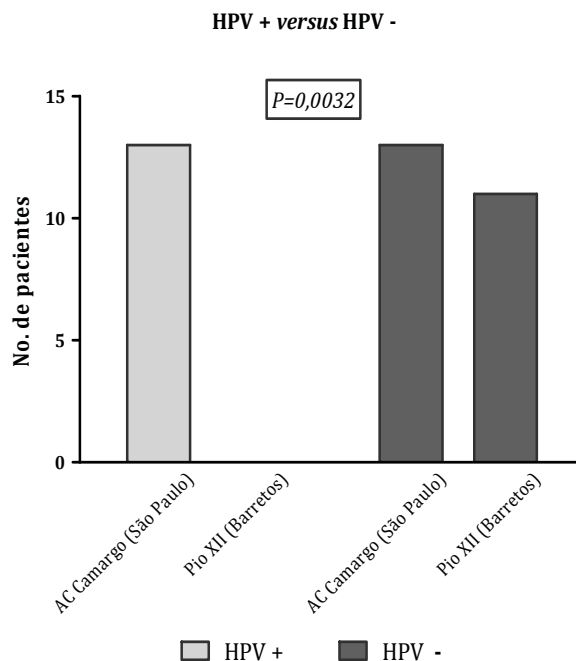


Figura 2. Representação gráfica da proporção de carcinomas de orofaringe positivos e negativos para infecção pelo HPV entre as duas instituições participantes ($P= 0,0032$; Teste exato de Fisher). Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.

4. Alterações no número de cópias genômicas

Foi possível a aplicação da metodologia de CGH-array em 32 das 37 amostras de carcinoma de orofaringe. Todos os genes e regiões genômicas detectadas como alteradas foram comparadas com o banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/> - Hg18) e com o banco de dados de amostras de indivíduos brasileiros saudáveis (82 pacientes).

Os dados de cada caso foram analisados pelo *software Nexus Copy Number version 5.0* (Biodiscovery), com critérios de qualidade inferiores a 0,30 para amostras de tecido a fresco e 0,35 para tecidos FFEP.

Os carcinomas de orofaringe avaliados apresentaram alterações genômicas significativas, que variam entre 9 e 253 alterações por caso, totalizando 3222 CNAs (média e DP de $100,7 \pm 62,1$). O grupo controle apresentou uma média de $6,8 \pm 3,7$ CNAs por indivíduo.

Dentre as alterações observadas (3222 CNAs), 1312 regiões corresponderam a ganhos, 256 estavam envolvidas em ganhos de alto nível, 1499 em perdas genômicas

de cópia única e 155 em deleções homozigotas (Figura 3). No total, foram encontradas 1568 regiões com ganhos genômicos (48,7%) e 1654 estavam envolvidas em perdas genômicas (51,3%).

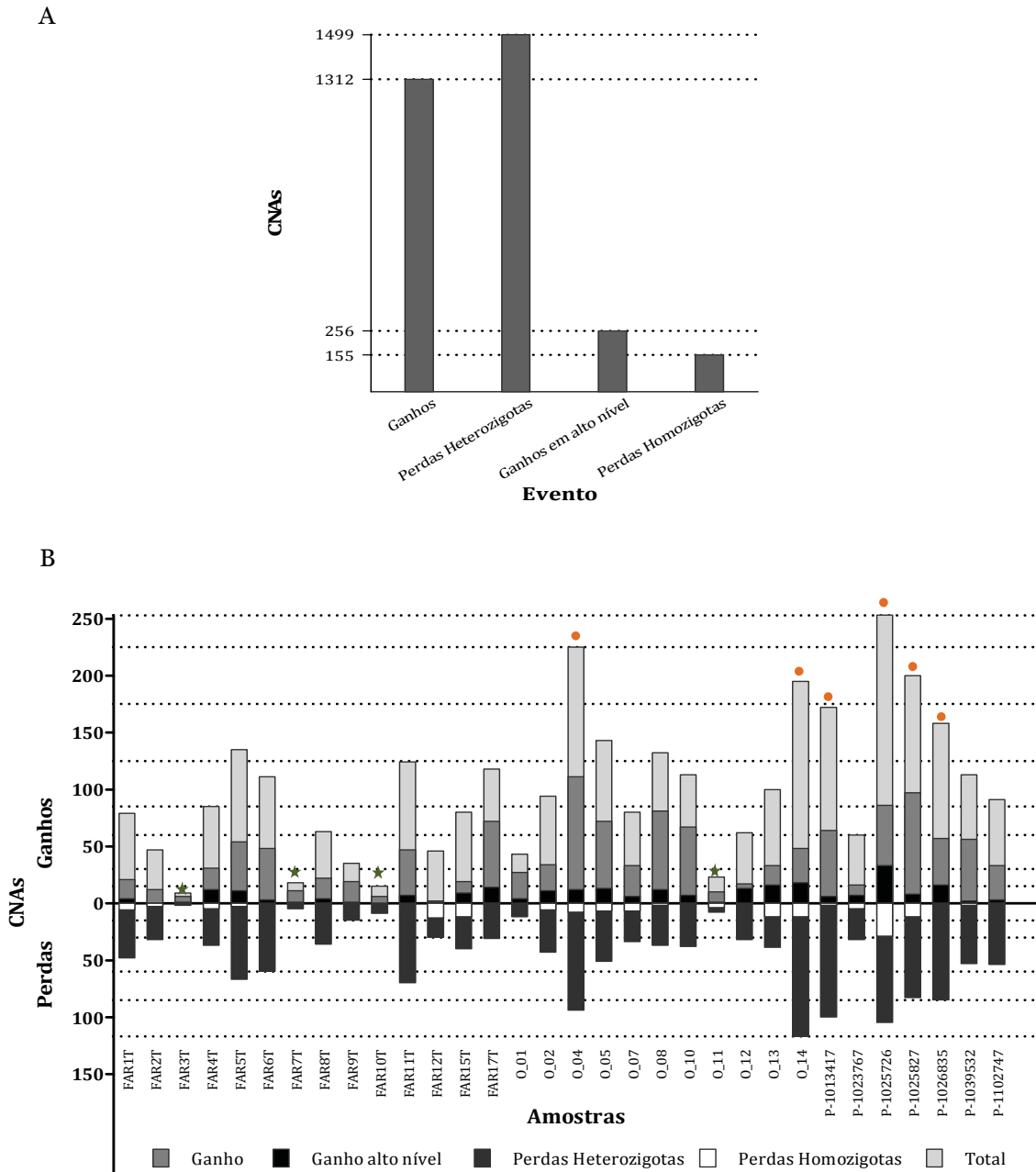


Figura 3. Representação gráfica do número de alterações totais no genoma (A) e caso a caso (B), distinguindo entre ganhos, ganhos em alto nível, perdas heterozigotas e homozigotas encontrados nos 37 casos de carcinomas de orofaringe avaliados por CGH-array. Em (A) observa-se uma prevalência não significativa de perdas genômicas e em (B) estão demonstradas amostras contendo um grande número de alterações (laranja) e outras com um pequeno número de CNAs (verdes). Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.

Os casos P-1025726 (253 CNAs), O-04 (225 CNAs), P-1025827 (200 CNAs), O-14 (195 CNAs), P-1013417 (172 CNAs) e 1026835 (158 CNAs) apresentaram maior número de alterações, enquanto os casos FAR3T (9 CNAs), FAR10T (15 CNAs), FAR7T (18 CNAs), O-11 (23 CNAs) e FAR9T (35 CNAs) demonstraram um padrão de alterações cromossômicas menos complexo (Figura 3B). Os casos HPV negativos apresentaram um grande número de CNAs enquanto a maioria dos pacientes HPV positivos (60%) apresentou um perfil genômico menos complexo (menor número de alterações genômicas).

Foi verificado um maior número de alterações genômicas envolvendo os cromossomos 3, 8, 2 e 1 (216, 208, 204 e 199 CNAs, respectivamente). Foram detectadas alterações em todos os cromossomos, inclusive os sexuais X e Y (Figura 4).

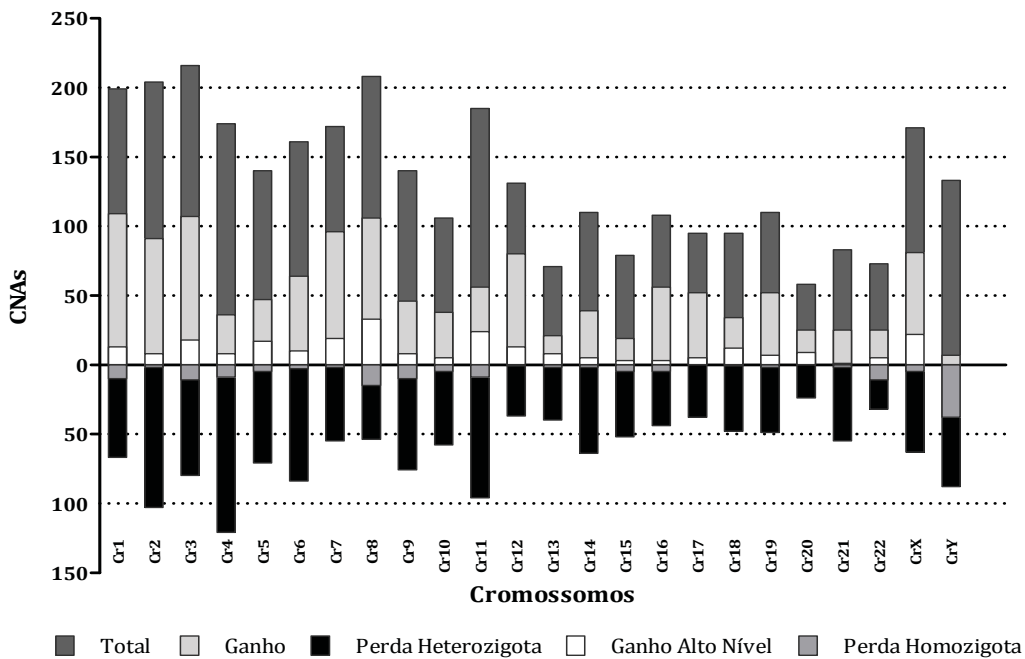


Figura 4. Representação gráfica do número de alterações em cada cromossomos, distinguindo entre ganhos, ganhos em alto nível, perdas heterozigotas e homozigotas. Observa-se um maior número de alterações nos cromossomos 3, 8, 2 e 1. Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.

Entre as alterações detectadas em mais de 20% dos casos, estão incluídas 115 perdas e 76 ganhos cromossômicos (191 alterações totais) (Tabela Suplementar 2). O tamanho das regiões de ganhos variaram de 16K a 104Mb (16.367 a 104.467.519pb),

envolvendo um total de 4.689 genes e 173 miRNAs, enquanto as perdas variaram de 38K a 90Mb (38.057 a 90.364.805pb), englobando regiões contendo 5.169 genes e 238 miRNAs. A diferença entre o tamanho das regiões alteradas envolvidas em ganhos e perdas genômicas não foi estatisticamente significativa (Figura 5).

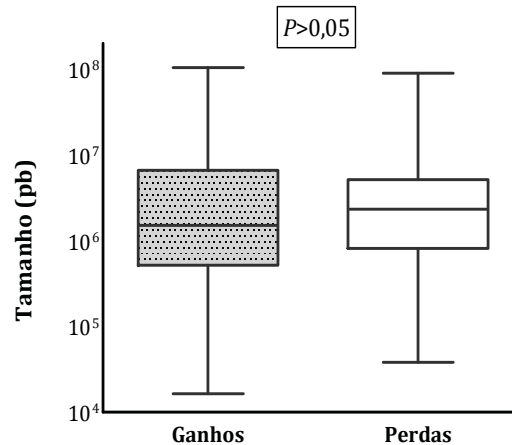


Figura 5. Representação gráfica do tamanho (pb) das alterações envolvidas em ganhos e perdas genômicas em 20% dos casos avaliados (teste de *Mann-Whitney*; $P > 0,05$). Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.

A figura 6 representa um ideograma dos ganhos (indicados à direita em verde) e perdas (indicadas à esquerda em vermelho) detectados nos casos de carcinoma de orofaringe. A figura 7 apresenta as alterações detectadas em cada um dos casos.

As alterações que estavam presentes em mais de 30% dos casos, tais como alterações em 3p26.3-p11.1 (37,5%), 8q11.1-q24.3 (40,6%) e 9p24.3-p13.1 (34,4%), estão representadas nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

Três regiões cromossômicas estavam alteradas em mais de 50% dos casos avaliados, todas compreendendo perdas no cromossomo Y, incluindo Yp11.31-q11.221 (50%), Yq11.222-q11.223 (56,3%) e Yq12 (68,8%). Essas regiões, juntas, compreendem um total de 111 genes (Tabela Suplementar 2; Figura 11).

As regiões com picos significativos de alterações ($P \leq 0,05$) e presentes em mais de 20% dos casos estão representados na tabela 7. Entre elas estão incluídas 11 regiões de perdas (envolvendo 154 genes) e 12 de ganhos cromossômicos (compreendendo 387 genes), totalizando 541 genes significativamente alterados.

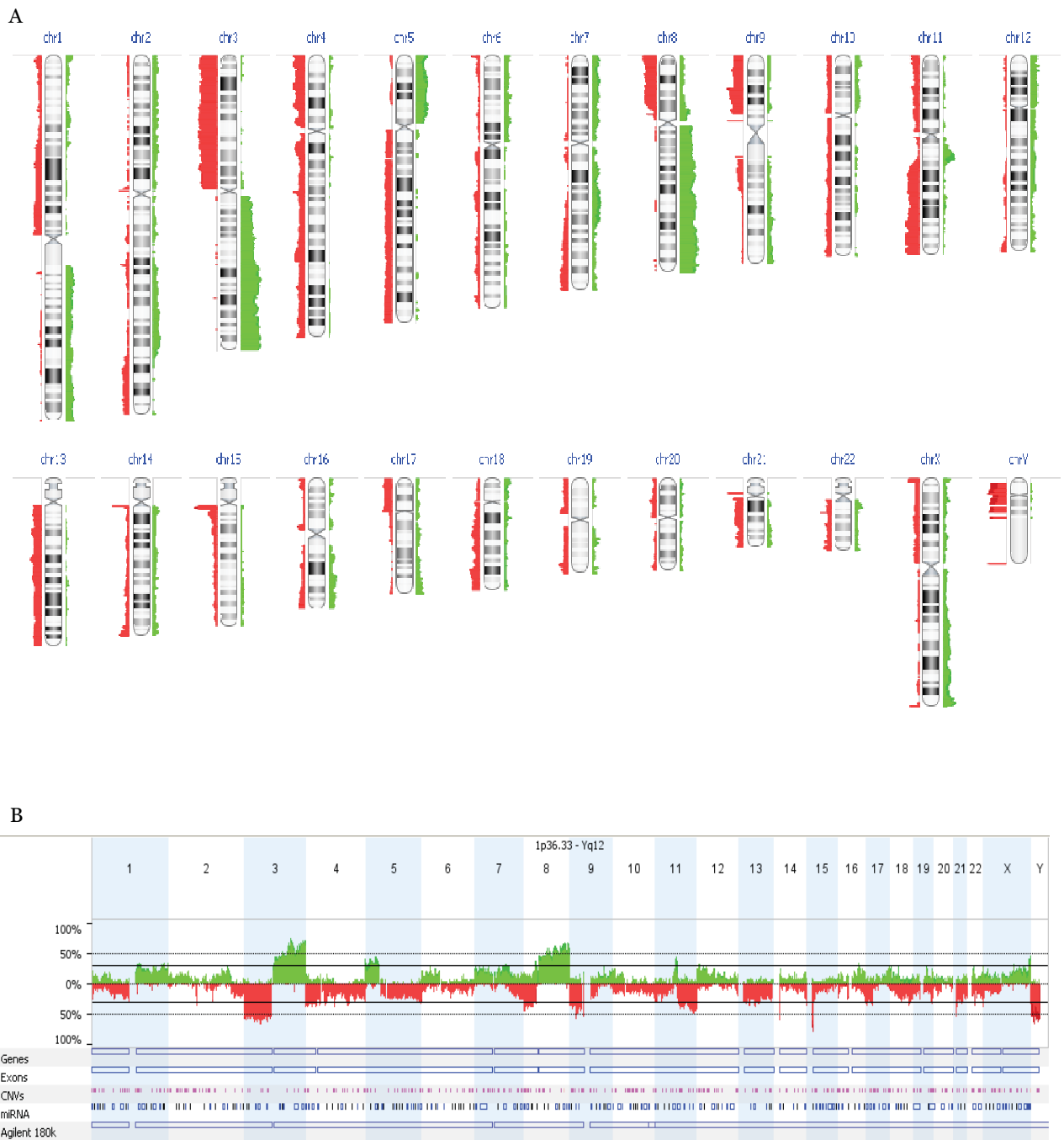


Figura 6. Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 32 casos de carcinomas de orofaringe avaliados pela técnica de CGH-array (A). Estão indicadas as regiões de ganhos ou ampliações (verde) e perdas (vermelho). (B) Representação das frequências de alterações em todos os cromossomos (chr1-chrY). Em verde estão representados os ganhos genômicos e em vermelho, as perdas cromossômicas, além da relação de genes, éxons, CNVs conhecidas e miRNA mapeados ao longo do genoma humano. Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number v. 5.0*.

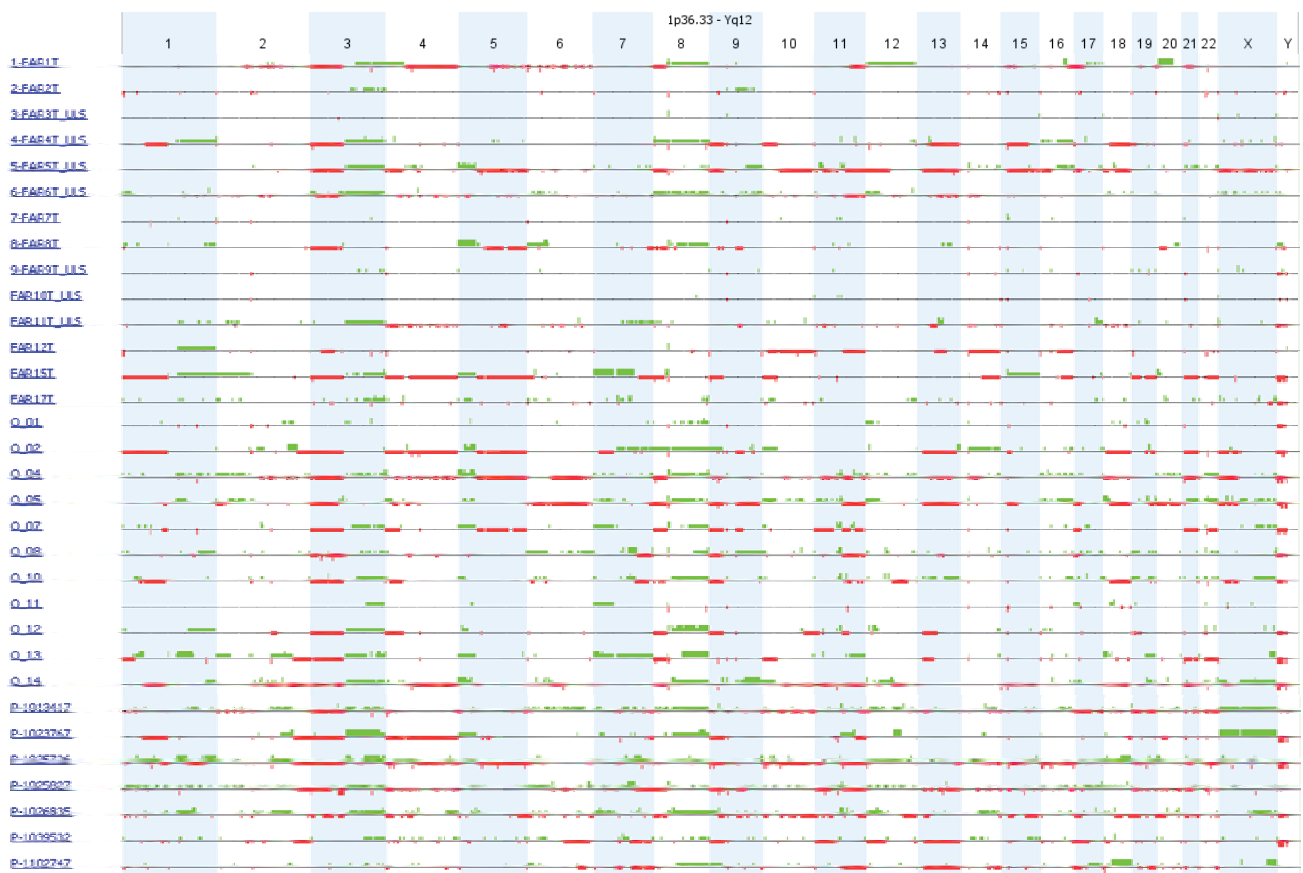


Figura 7. Alterações no número de cópias apresentadas caso a caso (vertical) e por cromossomos (horizontal - cromossomo 1 ao Y) detectadas nos casos de carcinoma de orofaringe analisados por CGH-array. Verde, regiões de ganhos e ampliações genômicas e vermelho, perdas. Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number v. 5.0*

Tabela 7. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 32 pacientes com carcinoma de orofaringe ($P \leq 0,05$).

Cromossomo 1	Tamanho (pb)	Evento	Frequência (%)	P-Valor	Genes	miRNAs	Casos
p36.33 - p36.32	2325768	Ganho	25,0	0,016	<i>LOC100288778; WASH7P; FAM138A; FAM138C; FAM138F; OR4F5; LOC100132062; LOC100132287; LOC100133331; OR4F29; OR4F3; MIR1977; OR4F16; OR4F29; OR4F3; LOC100133331; NCRNA00115; LOC643837; FAM41C; FLJ39609; SAMD11; NOC2L; KLHL17; PLEKHN1; C1orf170; HES4; ISG15; AGRN; C1orf159; MIR200B; MIR200A; MIR429; TTL10; TNFRSF18; TNFRSF4; SDF4; B3GALT6; FAM132A; LOC100128842; UBE2L2; SCN1D; ACAP3; PUSL1; CPSF3L; GLTPD1; TAS1R3; DVL1; MXRA8; AURKAIP1; CCNL2; LOC148413; MRPL20; LOC441869; TMEM88B; VWAI; ATAD3C; ATAD3B; ATAD3A; C1orf70; SSU72; MIB2; MMP23B; MMP23A; SLC35E2; CDK11B; CDK11A; NADK; GNB1; CALML6; TMEM52; KIAA1751; GABRD; PRKCZ; LOC100128003; C1orf86; SKI; LOC100129534</i>	5	FAR6T; FAR17T; O_04; O_07; O_08; O_12; 1025726; 1039532 (*)
Cromossomo 2							
q22.1	13027	Perda	28,1	0,039	<i>LRP1B</i>	0	FAR1T; FAR4T; 6-FAR6T; O_04; O_10; O_12; O_14; 1023767; 1025726 (*)
q22.1	220451	Perda	28,1	0,039	<i>LRP1B</i>	0	FAR1T; FAR6T; O_04; O_12; O_13; O_14; 1023767; 1025726; FAR4T; O_07
q32.2 - q32.3	2423444	Ganho	28,1	0,020	<i>SLC40A1; ASNSD1; ANKAR; OSGEPL1; ORMDL1; PMS1; MSTN; C2orf88; HIBCH; INPP1; MFSD6; TMEM194B; NAB1; GLS; STAT1; STAT4; MYO1B; OBFC2A; SDPR; TMEFF2</i>	0	O_01; O_02; O_13; 1013417; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1102747 (*)
Cromossomo 3							
q25.1	1050037	Ganho	75,0 (**)	0,045	<i>RNF13; PFN2; TSC2D2; SERP1; EIF2A; SELT; FAM194A; SLAH2; CLRN1</i>	0	FAR1T; FAR2T; FAR4T; FAR5T; FAR6T; FAR9T; FAR11T; FAR15T; FAR17T; O_04; O_07; O_08; O_10; O_11; O_12; O_13; O_14; 1013417; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747 (*)
Cromossomo 8							
p12	1812420	Ganho	37,5 (**)	0,017	<i>KCNU1; ZNF703; ERLIN2; LOC728024; PROSC; GPR124; BRF2; RAB11FIP1</i>	0	FAR1T; FAR4T; FAR6T; FAR15T; O_02; O_05; O_11; 1013417; 1023767; 1025827; 1026835; FAR8T; O_13

p12 - p11.23	1454723	Ganho	37,5 (**)	0,017	<i>EIF4EBP1; ASH2L; STAR; LSM1; BAG4; DDHD2; PPAPDC1B; WHSC1L1; LETM2; FGFR1; C8orf86; RNF5P1; TACC1; PLEKHA2; HTRA4; TM2D2; ADAM9; ADAM32</i>	0	FAR1T; FAR6T; FAR8T; O_04; 1013417; 1023767; 1025827; 1026835; FAR3T; FAR4T; FAR12T; FAR15T; O_02; O_05; O_07; O_08; O_12
Cromossomo 9							
p21.3	157773	Perda	56,3 (**)	0,009	<i>C9orf53; CDKN2A; CDKN2B; CDKN2BAS</i>	0	FAR2T; FAR4T; FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_05; O_07; O_08; O_10; O_12; O_13; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; O_04; O_14
p21.3	353974	Perda	56,3 (**)	0,009		0	FAR2T; FAR4T; FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_04; O_05; O_07; O_08; O_10; O_12; O_13; O_14; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532 (*)
q31.3	43873	Ganho	28,1	0,013	<i>IKBKAP; C9orf6; CTNNA1</i>	0	FAR2T; FAR5T; FAR6T; O_02; O_08; O_14; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
Cromossomo 11							
q13.1 - q13.3	5406496	Ganho	31,3 (**)	0,008	<i>FRMD8; NEAT1; MIR612; MALAT1; SCYL1; LTBP3; SSSCA1; FAM80B; EHBPI1; KCNK7; MAP3K11; PCNXL3; SIPA1; RELA; KAT5; RNASEH2C; DKFZp761E198; OVOL1; SNX32; CFL1; MUS81; EFEMP2; CTSW; FIBP; CCDC85B; FOSL1; C11orf68; DRAP1; TSGA10IP; SART1; EIF1AD; BANF1; CST6; CATSPER1; GAL3ST3; SF3B2; PACS1; KLC2; RAB1B; CNIH2; YIF1A; TMEM151A; CD248; RIN1; BRMS1; B3GNT1; SLC29A2; NPAS4; MRPL11; PELI3; DPP3; BBS1; ZDHHC24; ACTN3; CTSF; CCDC87; CCS; RBM14; RBM4; RBM4B; SPTBN2; C11orf80; RCE1; LRFN4; PC; C11orf86; SYT12; RHOD; KDM2A; ADRBK1; ANKRD13D; SSH3; POLD4; LOC100130987; CLCF1; RAD9A; PPP1CA; TBC1D10C; CARN1; RPS6KB2; PTPRCAP; CORO1B; GPR152; CABP4; TMEM134; AIP; PITPNM1; CDK2AP2; CABP2; GSTP1; NDUFV1; DOC2GP; NUDT8; TBX10; ACY3; ALDH3B2; LOC645332; UNC93B1; ALDH3B1; NDUFS8; TCIRG1; CHKA; SUV420H1; C11orf24; LRP5; SAPS3; GAL; MTL5; CPT1A; MRPL21; IGHMBP2; MRGPRD; MRGPRF; TPCN2; MYEOV; CCND1; ORAOV1; FGF19; FGF4; FGF3; ANO1; FADD; MIR548K; PPFIA1; CTTN; SHANK2</i>	2	O_04; O_07; O_08; O_10; 1023767; 1025827; 1026835; FAR4T; FAR5T; FAR7T; FAR10T; O_05; O_12; 1013417; 1025726; 1039532

Cromossomo 14							
q32.33	192496	Perda	31,3 (**)	0,013		0	FAR2T; FAR8T; FAR10T; FAR11T; FAR12T; FAR15T; 1025726; 1025827; 1026835; 1102747 (*)
Cromossomo 16							
q22.1	15008	Ganho	34,4 (**)	0,021	DPEP2	0	FAR1T; FAR4T; FAR5T; O_02; O_04; O_05; O_07; O_08; 1013417; 1025827; 1039532 (*)
Cromossomo 18							
q12.1	591047	Ganho	21,9	0,048	DSC3; DSC2; DSC1; DSG1; DSG4; DSG3; DSG2	0	O_01; O_11; 1025726; 1025827; 1026835; 1102747; FAR5T; 1013417; 1039532
Cromossomo 19							
q13.12	194976	Ganho	28,1	0,004	GAPDHS; TMEM147; ATP4A; HAUS5; RBM42; ETV2; COX6B1; UPK1A; ZBTB32; MLL4; TMEM149	0	FAR5T; FAR9T; O_01; O_05; O_08; O_10; O_13; O_14; 1025726 (*)
q13.41	773976	Perda	34,4 (**)	0,003	ZNF160; ZNF415; ZNF347; ZNF665; ZNF677; VN1R2; VN1R4; BIRC8; ZNF845; ZNF525; ZNF765; LOC147804; ZNF761; ZNF813; ZNF331; LOC284379; DPRX; MIR512-1; MIR512-2; MIR1323; MIR498; MIR520E; MIR515-1; MIR515-2; MIR519E; MIR520F; MIR519C; MIR1283-1; MIR520A; MIR526B; MIR519B; MIR525; MIR523; MIR518F; MIR520B; MIR518B; MIR526A1; MIR520C; MIR518C; MIR524; MIR517A; MIR519D; MIR521-2; MIR520D; MIR517B; MIR520G; MIR516B2; MIR526A2; MIR518E; MIR518A1; MIR518D; MIR516B1; MIR518A2; MIR517C; MIR520H; MIR521-1; MIR522; MIR519A1; MIR527; MIR516A1; MIR1283-2; MIR516A2; MIR519A2; MIR371; MIR372	48	FAR4T; FAR15T; O_02; O_05; O_14; 1013417; 1023767; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747 (*)
Cromossomo 22							
q11.21	1051556	Ganho	25,0	0,014	DGCR6L; PI4KAP1; RIMBP3; ZNF74; SCARF2; KLHL22; MED15; POM121L4P; TMEM191A; SERPIND1; PI4KA; SNAP29; CRKL; AIFM3; LZTR1; THAP7; FLJ39582; MGC16703; P2RX6	0	FAR5T; O_04; O_05; O_07; O_08; O_10; O_11; O_12; O_14
Cromossomo X							
p22.33	2705340	Perda	31,3 (**)	0,027	PLCXD1; PPP2R3B; SHOX; CRLF2; CSF2RA; IL3RA; SLC25A6; NCRNA00105; ASMTL; P2RY8; SFRS17A; ASMT; DHRSX; ZBED1; NCRNA00103; CD99; XGPY2; XG	0	FAR2T; FAR15T; 1013417; 1023767; 1025726; 1026835; 1039532; FAR3T; FAR5T; FAR8T; FAR11T; FAR12T; O_02; O_04; O_05; O_13; 1102747

q28	1996994	Ganho	40,6 (**)	0,009	GABRQ; MAGEA6; CSAG2; CSAG3; MAGEA2; MAGEA2B; MAGEA12; CSAG1; MAGEA2; MAGEA3; CETN2; NSDHL; ZNF185; PNMA5; PNMA3; PNMA6A; LOC100287428; MAGEA1; ZNF275; ZFP92; TREX2; HAUS7; BGN; ATP2B3; FAM58A; DUSP9; PNCK; SLC6A8; BCAP31; ABCD1; PLXNB3; SRPK3; IDH3G; SSR4; PDZD4; LICAM; AVPR2; ARHGAP4; NAA10; RENBP; HCFC1; TMEM187; IRAK1; MIR718; MECP2; OPN1LW; OPN1MW2; OPN1MW; TEX28; TKTL1; FLNA; EMD; RPL10; SNORA70; DNASE1L1; TAZ; ATP6AP1; GDI1; FAM50A; PLXNA3; LAGE3; UBL4A; SLC10A3; FAM3A; G6PD; IKBKG; NCRNA00204; NCRNA00204B; CTAG1A; CTAG1B; CTAG2	0	O_04; O_08; O_10; O_13; O_14; 1013417; 1025827; 1026835; 1102747; FAR6T; FAR17T; O_05; O_07; 1025726; 1039532
q28	321945	Perda	21,9	0,000	SPRY3; VAMP7; IL9R	0	FAR2T; FAR15T; O_02; 1025726; 1025827; 1039532; FAR5T; FAR8T; FAR11T; FAR12T; O_04; O_08
Cromossomo Y							
p11.2 - q11.221	7551525	Perda	50,0 (**)	0,000	GYG2P1; TTTY15; USP9Y; DDX3Y; UTY; TMSB4Y; VCY; VCY1B; NLGN4Y	0	FAR15T; FAR17T; O_01; O_02; O_04; O_05; O_07; O_08; O_10; O_12; O_13; O_14; 1025726; 1026835; 1039532; FAR2T; FAR4T; FAR8T; FAR9T; FAR11T; 1013417; 1025827
q11.222 - q11.223	4018584	Perda	56,3 (**)	0,000	TTY9A; TTTY9B; HSFY1; HSFY2; NCRNA00185; CD24; TTTY14; BCORL2; CYorf15A; CYorf15B; KDM5D; TTTY10; EIF1AY; RPS4Y2; RBMY2EP; TTTY13; RBMY1A1; RBMY1B; RBMY1D; RBMY1E; PRY; PRY2; TTTY6; TTTY6B; RBMY1F; RBMY1J; TTTY5; RBMY2FP; PRY; PRY2	0	FAR2T; FAR8T; FAR11T; FAR15T; O_01; O_02; O_04; O_05; O_07; O_08; O_10; O_12; O_13; O_14; 1025726; 1026835; 1039532; FAR9T; FAR17T; 1013417
q12	361222	Perda	68,8 (**)	0,000	SPRY3; VAMP7; IL9R	0	FAR4T; FAR5T; FAR6T; FAR9T; FAR12T; FAR15T; FAR17T; O_02; O_04; O_05; O_07; O_10; O_12; O_13; O_14; 1013417; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747 (*)

(*): Casos que englobam somente alterações completas das regiões; (**): Alterações presentes em mais de 30% dos casos avaliados.

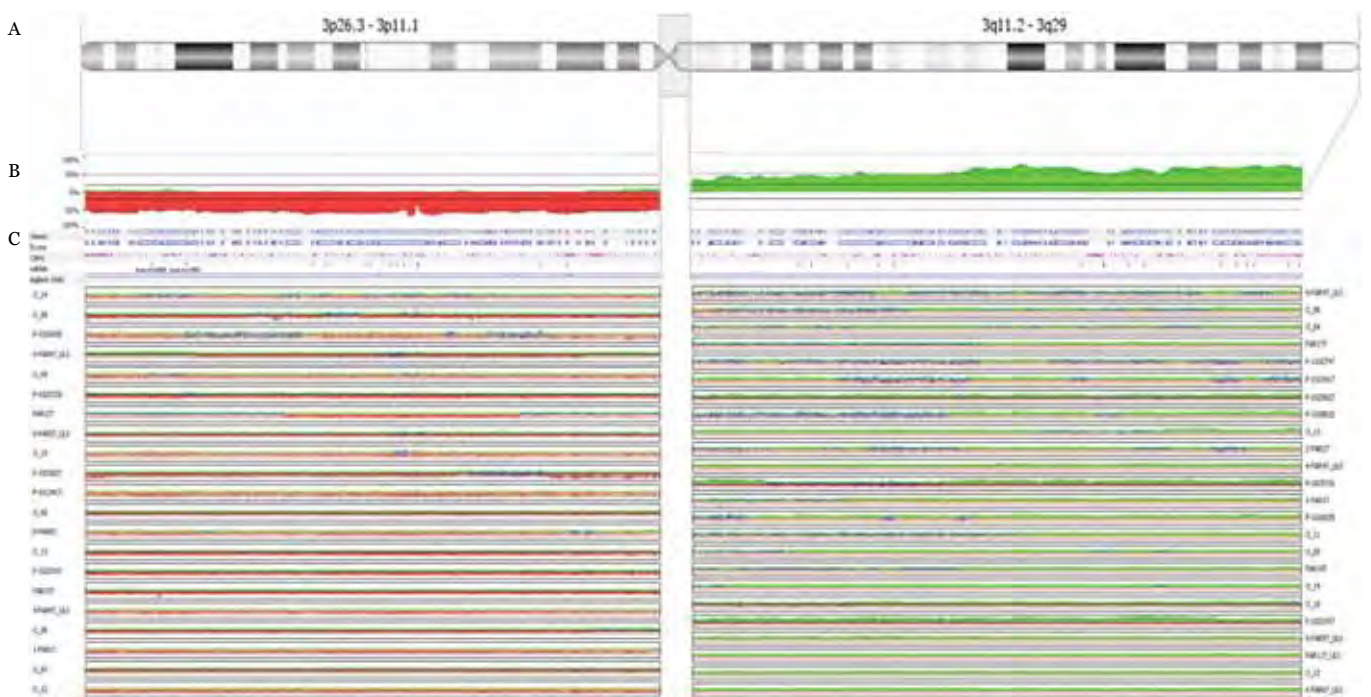


Figura 8. Representação gráfica das perdas (3p indicados em vermelho) e ganhos genômicos (3q, indicados em verde) encontradas no cromossomo 3 e presentes em mais de 25% dos casos. (A) Cromossomo 3 e suas regiões alteradas; (B) Perfil e frequência das alterações genômicas encontradas no braço curto - perdas/vermelho - e longo - ganhos/verde - do cromossomo 3; (C) Localização dos genes, éxons, CNVs descritas (rosa) e miRNAs mapeados nessas regiões. Abaixo, o perfil de hibridação das sondas que cobrem essas regiões do cromossomo 3. Essas regiões possuem casos com alterações completas (todas as sondas alteradas ao longo do braço) e outras parciais, onde se verifica a presença de sondas inalteradas (azul). Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number software, v. 5.0*.

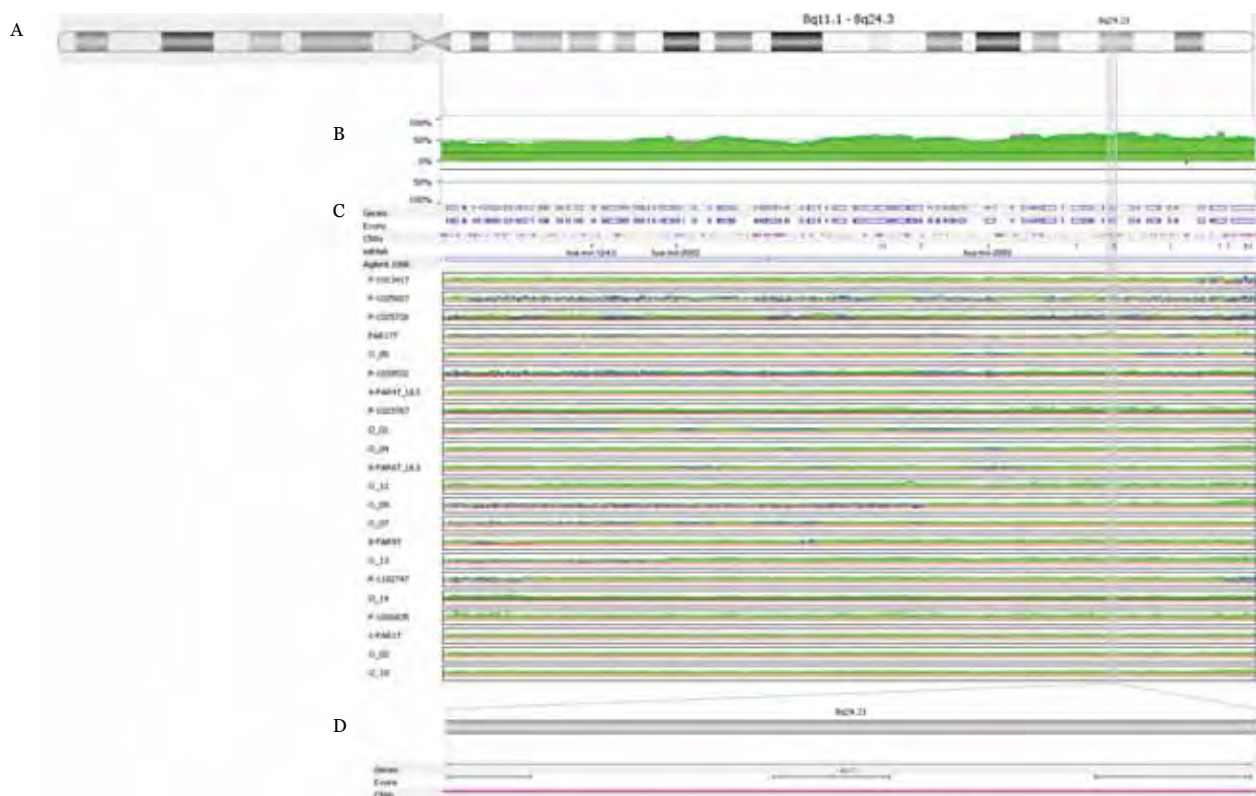


Figura 9. Representação gráfica das alterações genômicas encontradas no cromossomo 8 e presentes em mais de 40% dos casos. (A) Cromossomo 8 e, em destaque, suas regiões alteradas; (B) Perfil e frequência dos ganhos genômicos encontrados no braço longo do cromossomo 3, em verde; (C) Localização dos genes, éxons, CNVs descritas (rosa) e miRNAs mapeados nessas regiões. Abaixo, o perfil de hibridação das sondas que cobrem essas regiões do cromossomo 3; (D) Destaque para a região 8q24.21, onde se mapeia o oncogene *MYC*. Essas regiões possuem casos com alterações completas e parciais, com a presença de sondas inalteradas (em azul). Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number software*, v. 5.0.

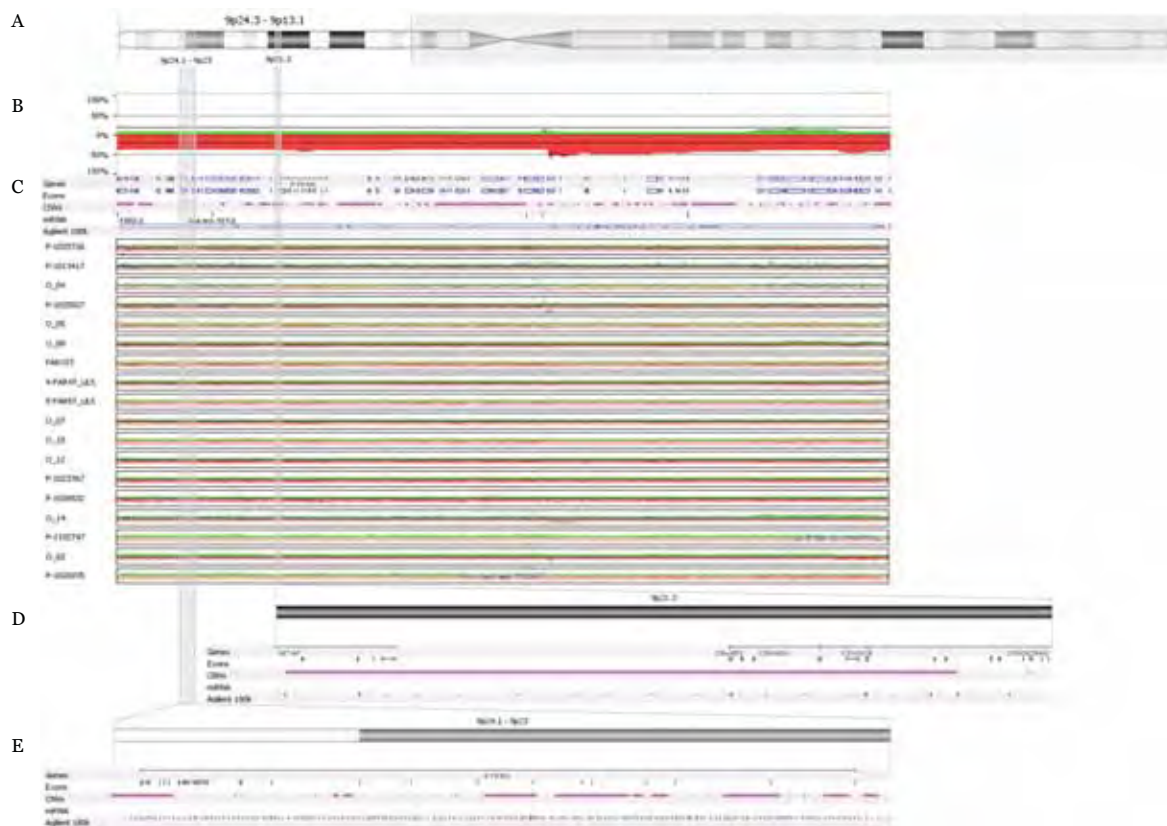


Figura 10. Representação gráfica das alterações genômicas encontradas no cromossomo 9 e presentes em mais de 30% dos casos. (A) Cromossomo 9 e, em destaque, suas regiões alteradas; (B) Perfil e frequência dos ganhos - verde - e perdas genômicas - vermelho - encontrados no braço longo do cromossomo 3; (C) Localização dos genes, éxons, CNVs descritas (rosa) e miRNAs mapeados nessas regiões. Abaixo, o perfil de hibridação das sondas que cobrem essas regiões; (D) Destaque para as regiões 9p24.1-p23 e 9p21.3, onde se mapeiam os genes *PTPRD* e, entre outros, *CDKN2A*, respectivamente. Em azul verifica-se a preseça de sondas inalteradas. Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number software*, v. 5.0.



Figura 11. Representação gráfica das perdas genômicas no cromossomo Y e presentes em mais de 50% dos casos (pelo menos 16/32 casos). (A) Cromossomo Y e suas regiões alteradas; (B) Perfil e frequência das perdas genômicas encontradas no braço curto e longo do cromossomo Y; (C) Localização dos genes, éxons, CNVs descritas (rosa) e ausência de miRNAs mapeados nessa região. Abaixo, o perfil de hibridação das sondas que cobrem essas regiões do cromossomo Y. Essas regiões possuem casos com alterações completas (perdas indicando as sondas assinaladas em vermelho) e alterações parciais; a presença de sondas inalteradas está indicado em azul. Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number software. v. 5.0.*

4.1. Associação das CNAs com a resposta ao tratamento

Foi realizada uma análise comparativa dos dados de alterações genômicas entre os casos que receberam carboplatina associada à RT (22 casos) para identificar regiões cromossômicas capazes de prever a resposta ao tratamento. Essa comparação foi realizada entre os casos que tiveram resposta completa (RC) ao tratamento proposto (13 pacientes) *versus* os que apresentaram resposta parcial, doença progressiva, não realizaram o tratamento ou perderam o seguimento (9 pacientes).

Os tumores com RC apresentaram perfil genômico menos complexo quando comparados aos demais, com uma média de 90 e 110 alterações totais por caso, respectivamente (Figuras 12A e B). Observa-se a predominância de ganhos genômicos nos casos que tiveram resposta completa, enquanto nos demais há uma pequena prevalência de perdas genômicas.

Foram identificadas 12 regiões cromossômicas capazes de diferenciar os pacientes destes dois grupos ($P \leq 0,05$) (Tabela 8). Todas as alterações observadas estavam presentes exclusiva ou preferencialmente nos casos com mau prognóstico (resposta parcial ou doença progressiva).

As alterações encontradas nos cromossomos 1, 9, 10 e 19 foram frequentemente detectadas nos tumores que apresentaram resposta parcial ou doença progressiva. Entre essas alterações, as regiões de perdas 1p21.3-p21.2, 1p21.2-p21.1 e 1p21.1 e ganhos em 10p13-p12.33 e 10p12.31-p12.1 estavam alteradas exclusivamente nos pacientes com resposta parcial ou doença progressiva (mais de 40% dos tumores) ($P \leq 0,017$), indicando seu potencial como alterações importantes associadas a resposta ao tratamento (Figura 13 A e B, respectivamente).

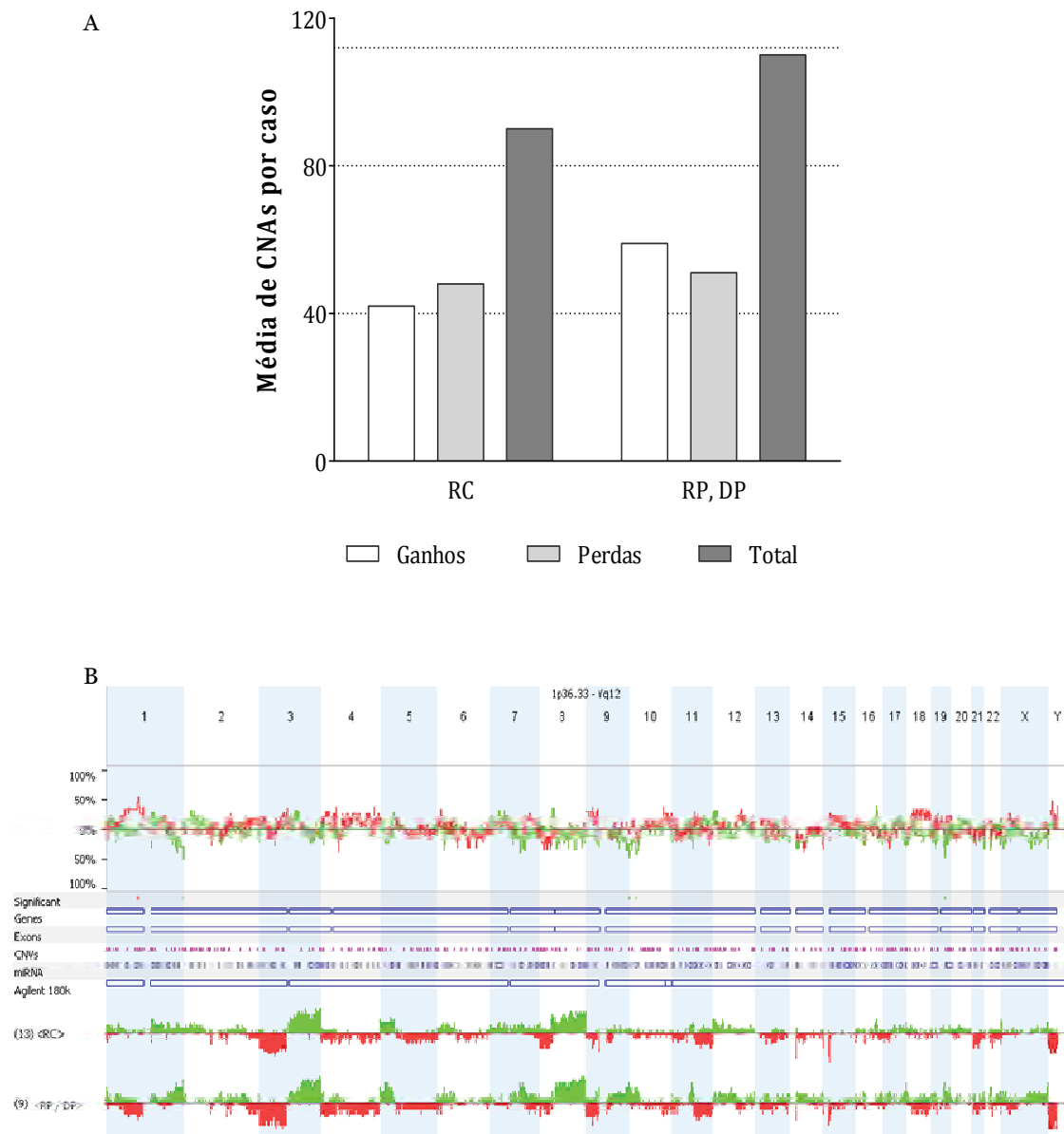


Figura 12. (A) Representação gráfica da média dos ganhos e perdas genômicas totais observados nos pacientes que mostraram resposta completa (RC) ou não (RP+ DP); (B) perfil de alterações cromossômicas entre esses grupos representando os ganhos (verde) e perdas genômicas (vermelho). Observa-se uma diferença não significativa entre as alterações do grupo com RC (90) e os demais pacientes (110 CNAs/caso). Imagens geradas pelos programas *Graphpad Prism 5* e *Nexus Copy Number, v. 5.0*, respectivamente.

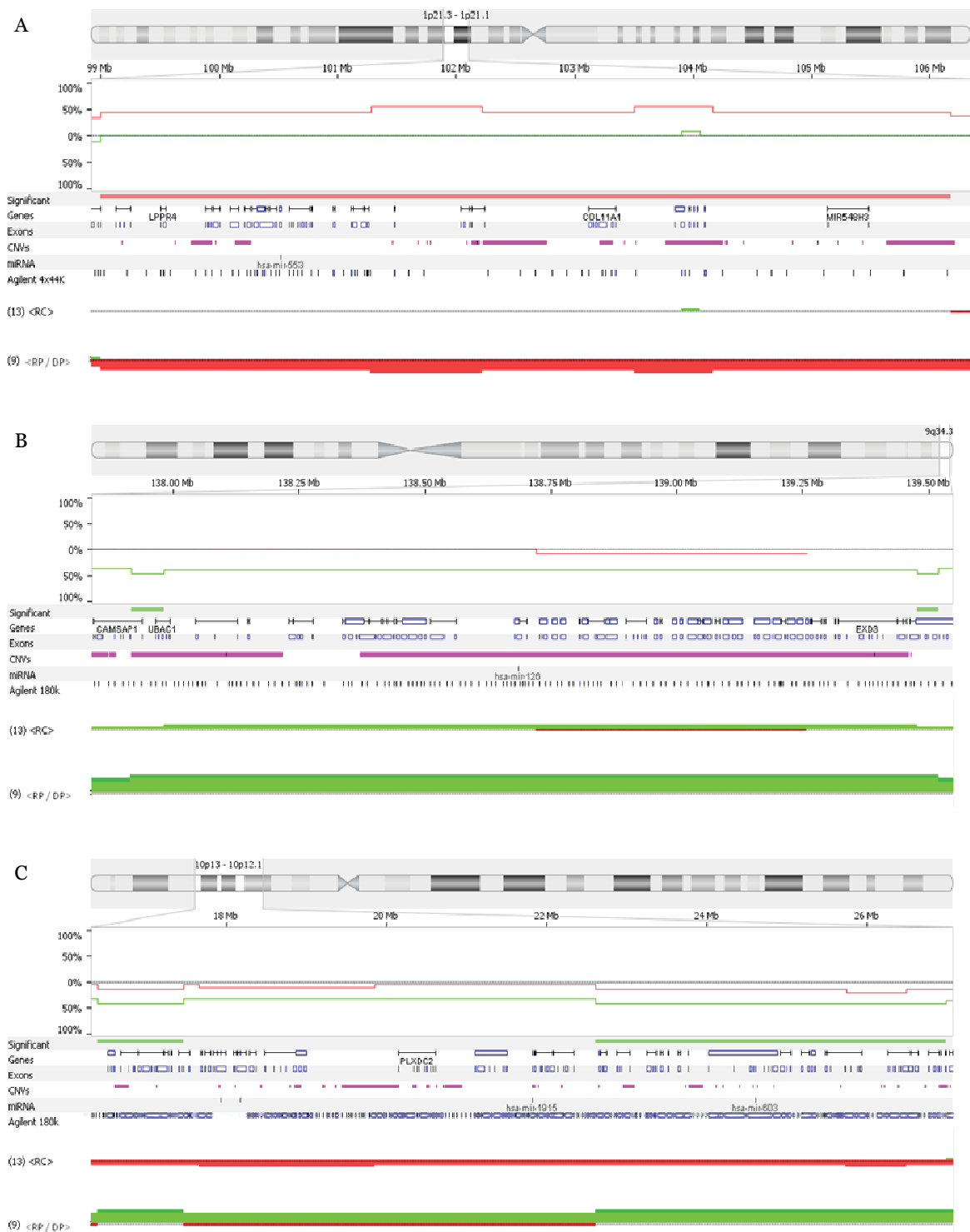


Figura 13. Representação gráfica dos ganhos (verde) e perdas genômicas (vermelho) observados entre os tumores cujos pacientes apresentaram resposta completa (13 casos) ou não (9 casos). (A) As perdas em 1p; (B) ganhos em 9q; (C) ganhos em 10p foram eventos exclusivos ou preferenciais dos tumores cujos pacientes apresentaram RP + DP. Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number software*, v. 5.0.

Tabela 8. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos pacientes associados ao padrão de resposta ao tratamento à carboplatina nos 22 casos de carcinomas de orofaringe.

Cromossomo 1	Início	Final	Tamanho (pb)	Evento	Genes	miRNAs	RC (%)	RP/DP (%)	Total (%)	P-Valor	Genes (*)
p21.3 - p21.2	99,002,102	101,281,846	2279744	Perda	19	1		44,4	44,4	0,017	<i>LPPR5; LPPR4; PALMD; FRRS1; AGL; SLC35A3; HIAT1; SASS6; CCDC76; LRRC39; DBT; RTCD1; MIR553; CDC14A; GPR88; VCAM1; EXTL2; SLC30A7; DPH5</i>
p21.2 - p21.1	101,281,846	102,213,872	932026	Perda	3	0		55,6	55,6	0,005	<i>S1PR1; HEJ1; OLFM3</i>
p21.1	102,213,872	103,503,370	1289498	Perda	2	0		44,4	44,4	0,017	<i>OLFM3; COL11A1</i>
p21.1	103,503,370	104,170,327	666957	Perda	13	0		55,6	55,6	0,005	<i>RNPC3; AMY2B; LOC648740; AMY2A; AMY1A; AMY1C; AMY1B</i>
p21.1	104,170,327	106,169,630	1999303	Perda	1	0		44,4	44,4	0,017	<i>MIR548H3</i>
q44	246,592,911	246,781,814	188903	Ganho	6	0	15,4	66,7	51,3	0,026	<i>OR2T6; OR2T1; OR2T2; OR2T3; OR2T5; OR2G6</i>
Cromossomo 9											
q34.3	137,916,641	137,981,732	65091	Ganho	2	0	7,7	55,6	47,9	0,023	<i>CAMSAP1; UBAC1</i>
q34.3	139,477,370	139,519,555	42185	Ganho	1	0	7,7	55,6	47,9	0,023	<i>PNPLA7</i>
Cromossomo 10											
p13 - p12.33	16,389,202	17,468,078	1078876	Ganho	7	0		44,4	44,4	0,017	<i>PTER; C1QL3; RSU1; CUBN; TRDMT1; VIM; ST8SIA6 COMMD3; BMI1; SPAG6; PIP4K2A; ARMC3; MSRB2; PTF1A; C10orf67; OTUD1; KIAA1217; PRINS; MIR603; ARHGAP21; PRTFDC1; ENKUR; THNSL1; LOC100128811; GPR158; MYO3A; GAD2; APBB1P; NCRNA00264; LOC731789</i>
p12.31 - p12.1	22,605,022	26,982,493	4377471	Ganho	23	1		44,4	44,4	0,017	
Cromossomo 19											
q13.2	44,013,717	44,446,235	432518	Ganho	14	0	7,7	55,6	47,9	0,023	<i>ECH1; HNRNPL; RINL; SIRT2; NFKBIB; SARS2; MRPS12; FBXO17; FBXO27; PAPL; PAK4; NCCRP1; SYCN; IL28B</i>
q13.2	45,359,373	45,948,123	588750	Ganho	19	1	7,7	55,6	47,9	0,023	<i>MAP3K10; TTC9B; CNTD2; AKT2; MIR641; C19orf47; PLD3; HIPK4; PRX; SERTAD1; SERTAD3; BLVRB; SPTBN4; SHKBP1; LTBP4; NUMBL; ADCK4; ITPKC; C19orf54</i>

RC: Resposta Completa; **RP:** Resposta Parcial; **DP:** Doença Progressiva.

4.2. Alterações no número de cópias associadas ao HPV

Foi realizada a comparação do padrão de alterações genômicas entre os casos HPV positivos (12) e negativos (20). Os tumores HPV positivos apresentaram perfil genômico contendo um menor número de alterações (73 CNAs) quando comparados a casos HPV negativos (117 CNAs) (Figuras 14 e 15A).

Nos casos HPV positivos, foi observado um maior número de perdas genômicas com relação à ganhos (42 *versus* 31, respectivamente). Em contrapartida, nos casos HPV negativos, houve uma maior prevalência de ganhos comparadas às perdas genômicas (60 *versus* 57, respectivamente), porém, nenhuma delas significativas ($P > 0,05$).

Foram identificadas regiões genômicas capazes de diferenciar os tumores com e sem a infecção por HPV ($P < 0,05$) (Tabela Suplementar 3). No total, foram encontradas 199 regiões genômicas alteradas, nas quais observam-se alterações presentes exclusivamente nos casos HPV negativos (96 CNAs) e HPV positivos (3 CNAs) (Tabela 9). As alterações nas regiões 7q22.1 (12 genes) e 14q12 (2 genes) apresentaram-se perdas exclusivamente no tumores HPV positivos ($P = 0,044$). Essas regiões compreendem os genes *ORAI2*, *ALKBH4*, *LRWD1*, *POLR2J*, *POLR2J3*, *SPDYE2*, *SPDYE2L*, *RASA4*, *UPK3BL*, *POLR2J2*, *SPDYE2*, *SPDYE2L* (7q22.1) e os genes *NOVA1*, *PRKD1* (14q12) (Figura 15B e C, respectivamente).

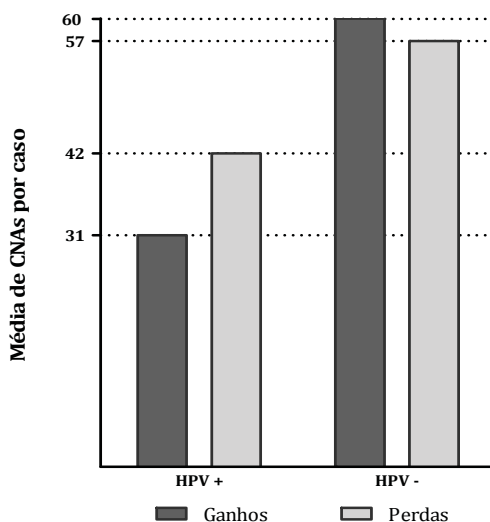


Figura 14. Representação gráfica do número de ganhos e perdas genômicas totais observados para tumores HPV positivos e negativos. Os casos HPV positivos apresentam menor CNAs quando comparados a tumores negativos.

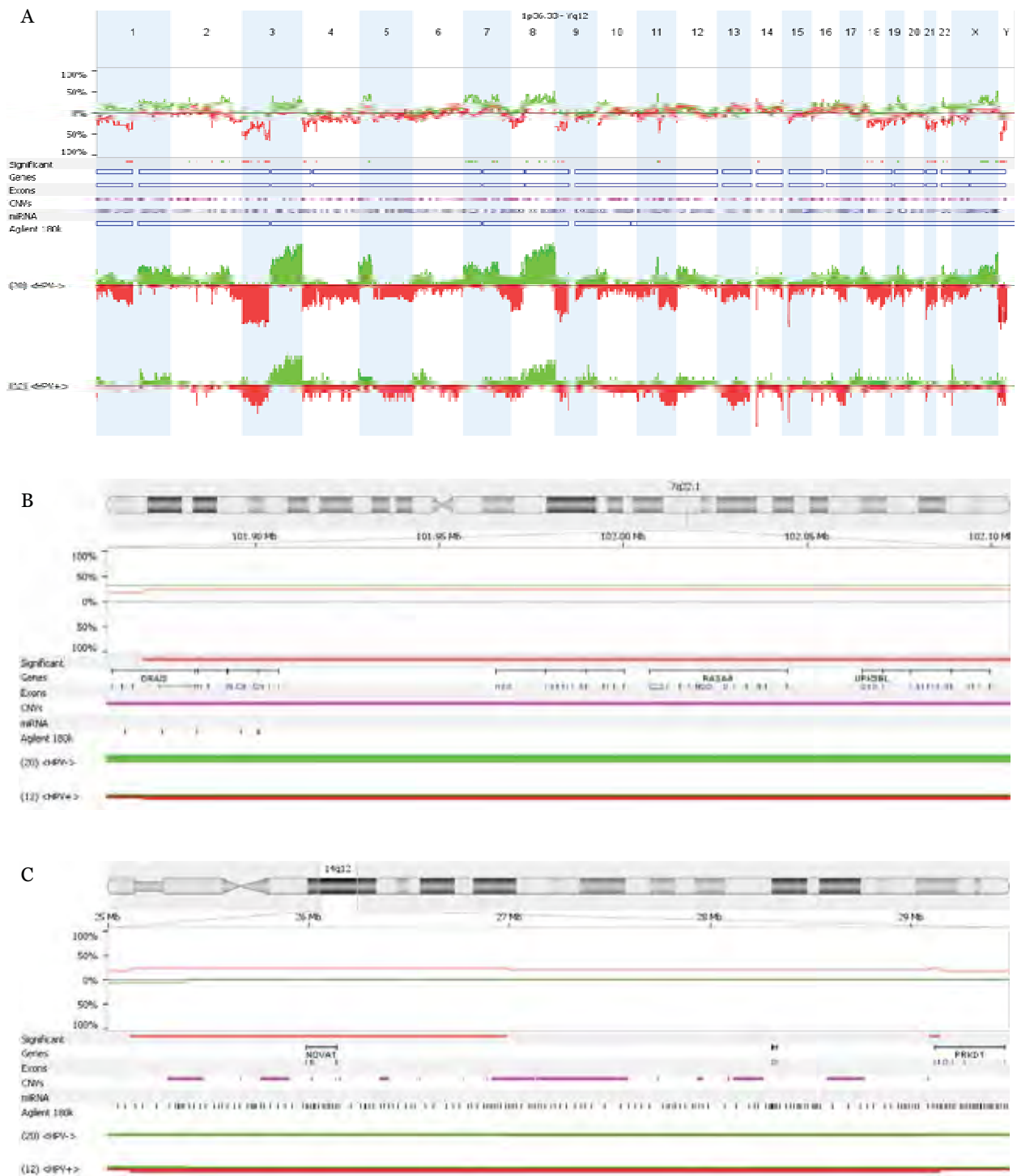


Figura 15. (A) Representação gráfica dos ganhos (verde) e perdas genômicas (vermelho) observados para tumores HPV positivos (12 casos) e negativos (20 casos). Os casos HPV negativos apresentam maior CNAs quando comparados a tumores positivos. Perdas genômicas nos cromossomos 7 (B) e 14 (C) foram eventos exclusivos dos tumores HPV positivos. Imagens geradas pelo programa *Nexus Copy Number software, v. 5.0*.

Tabela 9. Alterações genômicas exclusivas dos tumores HPV positivos ou negativos, encontradas em mais de 20% dos 32 casos de carcinomas de orofaringe.

Cromossomo 1	Início	Final	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	HPV- (%)	HPV+ (%)	Total (%)	P-Valor
p21.3 - p21.2	99,002,102	101,281,846	Perda	19	1	2279744	35,0		35,0	0,029
p21.2	101,281,846	101,648,251	Perda	1	0	366405	40,0		40,0	0,014
p13.3	107,697,876	108,457,450	Perda	2	0	759574	35,0		35,0	0,029
p13.3	108,457,450	108,875,868	Perda	3	0	418418	40,0		40,0	0,014
p13.3	108,875,868	108,976,479	Perda	1	0	100611	45,0		45,0	0,012
p13.3 - p13.2	108,976,479	115,398,442	Perda	100	1	6421963	40,0		40,0	0,014
p13.2 - p13.1	115,398,442	115,944,559	Perda	2	0	546117	35,0		35,0	0,029
p13.1 - p12	117,592,241	120,339,536	Perda	18	0	2747295	40,0		40,0	0,014
p12	120,339,536	120,378,939	Perda	1	0	39403	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 2										
p14	64,703,678	65,083,911	Ganho	2	0	380233	35,0		35,0	0,029
q22.1	141,759,302	141,769,424	Perda	1	0	10122	35,0		35,0	0,029
q31.1	171,488,247	173,265,097	Ganho	13	0	1776850	35,0		35,0	0,029
q31.1	173,265,097	174,809,370	Ganho	6	0	1544273	40,0		40,0	0,014
q31.1 - q31.2	174,809,370	178,950,282	Ganho	34	3	4140912	35,0		35,0	0,029
q33.1	197,535,455	197,602,912	Ganho	1	0	67457	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 4										
p16.1	7,862,426	8,037,401	Perda	2	0	174975	40,0		40,0	0,014
p16.1	8,037,401	9,511,817	Perda	22	2	1474416	45,0		45,0	0,012
p12	46,443,736	46,620,264	Perda	2	0	176528	45,0		45,0	0,012
p12	46,620,264	46,654,378	Perda	1	0	34114	40,0		40,0	0,014
p12	46,654,378	46,776,244	Perda	2	0	121866	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 7										
p22.1	4,626,354	5,815,863	Ganho	16	1	1189509	40,0		40,0	0,014
p22.1	5,815,863	6,213,280	Ganho	10	0	397417	35,0		35,0	0,029
p22.1	6,213,280	6,387,734	Ganho	3	0	174454	40,0		40,0	0,014
p22.1	6,387,734	6,785,715	Ganho	11	0	397981	35,0		35,0	0,029
p21.3 - p21.2	11,023,940	14,400,618	Ganho	8	0	3376678	35,0		35,0	0,029
p21.2	14,400,618	15,145,863	Ganho	1	0	745245	40,0		40,0	0,014
p21.2 - p21.1	15,145,863	16,131,713	Ganho	3	0	985850	35,0		35,0	0,029
p21.1	16,131,713	16,217,158	Ganho	1	0	85445	40,0		40,0	0,014
p21.1	16,217,158	18,747,714	Ganho	11	1	2530556	45,0		45,0	0,012
p21.1	18,747,714	18,979,266	Ganho	1	0	231552	40,0		40,0	0,014
p21.1 - p15.3	18,979,266	19,731,842	Ganho	5	0	752576	35,0		35,0	0,029
p15.3	19,731,842	20,552,392	Ganho	3	0	820550	40,0		40,0	0,014
p15.3	20,552,392	24,677,625	Ganho	25	1	4125233	35,0		35,0	0,029
p15.3 - p15.2	24,677,625	27,099,700	Ganho	16	1	2422075	40,0		40,0	0,014
p15.2	27,099,700	27,273,173	Ganho	14	1	173473	45,0		45,0	0,012
p15.2 - p15.1	27,273,173	28,628,879	Ganho	5	0	1355706	40,0		40,0	0,014
p15.1	28,628,879	30,656,940	Ganho	18	1	2028061	35,0		35,0	0,029
p15.1	30,656,940	30,700,943	Ganho	1	0	44003	40,0		40,0	0,014
p14.2	35,932,733	36,341,507	Ganho	2	0	408774	35,0		35,0	0,029
p14.2	36,341,507	37,199,065	Ganho	5	1	857558	40,0		40,0	0,014
p14.2 - p14.1	37,199,065	39,862,475	Ganho	15	0	2663410	35,0		35,0	0,029

p13	43,822,737	45,074,449	Ganho	29	0	1251712	40,0	40,0	0,014
p13 - p12.3	45,074,449	47,953,877	Ganho	15	0	2879428	35,0	35,0	0,029
q21.3	92,634,774	92,865,048	Ganho	2	0	230274	40,0	40,0	0,014
q21.3	92,865,048	93,655,956	Ganho	7	2	790908	45,0	45,0	0,012
q21.3	93,655,956	94,249,379	Ganho	4	0	593423	40,0	40,0	0,014
q21.3	94,249,379	94,669,549	Ganho	1	0	420170	35,0	35,0	0,029
q21.3	94,669,549	95,277,122	Ganho	7	0	607573	40,0	40,0	0,014
q22.1	101,869,617	102,157,870	Perda	12	0	288253		25,0 -25,0	0,044
q31.1	107,276,878	109,326,098	Ganho	8	0	2049220	40,0	40,0	0,014
q31.1	109,326,098	109,807,585	Ganho	1	0	481487	45,0	45,0	0,012
q31.1	109,916,697	110,272,110	Ganho	1	0	355413	45,0	45,0	0,012
q31.1	110,272,110	110,363,677	Ganho	1	0	91567	40,0	40,0	0,014
q31.1	110,363,677	110,465,752	Ganho	1	0	102075	35,0	35,0	0,029
q31.1	110,861,896	110,910,157	Ganho	1	0	48261	35,0	35,0	0,029
q31.1	110,910,157	111,199,074	Ganho	2	0	288917	40,0	40,0	0,014
Cromossomo 11									
q13.4	72,684,187	72,860,821	Perda	4	0	176634	35,0	35,0	0,029
q13.4	72,860,821	73,193,530	Perda	4	0	332709	40,0	40,0	0,014
q13.4	73,193,530	73,332,105	Perda	3	0	138575	45,0	45,0	0,012
q13.4	73,332,105	74,414,973	Perda	15	0	1082868	50,0	50,0	0,004
Cromossomo 14									
q12	25,109,029	26,987,720	Perda	1	0	1878691		25,0 -25,0	0,044
q12	29,093,395	29,148,248	Perda	1	0	54853		25,0 -25,0	0,044
Cromossomo 18									
p11.31	3,642,745	4,019,037	Ganho	1	0	376292	40,0	40,0	0,014
q11.1	16,100,000	17,205,887	Perda	2	0	1105887	35,0	35,0	0,029
q12.2	31,974,066	32,386,658	Perda	3	0	412592	35,0	35,0	0,029
Cromossomo 19									
q13.12	40,316,838	40,333,205	Ganho	3	0	16367	35,0	35,0	0,029
q13.12	40,613,207	40,709,640	Ganho	4	0	96433	35,0	35,0	0,029
q13.12	41,087,006	41,232,253	Ganho	8	0	145247	35,0	35,0	0,029
q13.13	43,144,499	43,183,106	Ganho	1	0	38607	35,0	35,0	0,029
q13.13	43,183,106	43,238,383	Ganho	1	0	55277	40,0	40,0	0,014
q13.13 - q13.2	43,238,383	44,013,717	Ganho	22	0	775334	35,0	35,0	0,029
Cromossomo 21									
q11.2 - q21.1	14,484,856	16,609,576	Perda	8	0	2124720	40,0	40,0	0,014
q21.1	16,609,576	16,717,763	Perda	1	0	108187	45,0	45,0	0,012
q21.1	16,717,763	16,835,920	Perda	3	2	118157	40,0	40,0	0,014
q21.1	16,835,920	16,850,718	Perda	1	0	14798	35,0	35,0	0,029
q21.1	17,662,102	17,842,905	Perda	1	0	180803	40,0	40,0	0,014
q22.12 - q22.13	36,486,326	37,232,409	Perda	6	0	746083	35,0	35,0	0,029
q22.13	37,232,409	38,493,200	Perda	10	0	1260791	40,0	40,0	0,014
q22.2	39,617,006	39,647,798	Perda	1	0	30792	35,0	35,0	0,029
q22.2	39,647,798	40,331,306	Perda	8	0	683508	45,0	45,0	0,012
q22.2	40,331,306	41,021,730	Perda	1	0	690424	40,0	40,0	0,014
q22.2 - q22.3	41,021,730	41,975,654	Perda	9	0	953924	35,0	35,0	0,029
q22.3	43,907,431	43,945,488	Perda	1	0	38057	35,0	35,0	0,029
Cromossomo 22									
q11.21	19,706,688	19,961,412	Ganho	4	1	254724	35,0	35,0	0,029

q12.3	30,951,175	30,989,798	Perda	1	0	38623	35,0	35,0	0,029
q12.3	31,233,458	32,863,247	Perda	3	0	1629789	35,0	35,0	0,029
Cromossomo X									
q21.33	96,689,383	96,762,268	Ganho	1	0	72885	35,0	35,0	0,029
q21.33 - q22.1	97,808,103	98,744,170	Ganho	1	0	936067	35,0	35,0	0,029
q22.1	98,744,170	99,261,219	Ganho	1	0	517049	40,0	40,0	0,014
q22.1 - q22.2	100,806,318	103,041,926	Ganho	34	0	2235608	35,0	35,0	0,029
q22.3	105,121,525	106,720,401	Ganho	11	0	1598876	35,0	35,0	0,029
q22.3	107,109,427	107,454,835	Ganho	5	0	345408	35,0	35,0	0,029
q22.3	108,777,271	109,440,468	Ganho	4	1	663197	35,0	35,0	0,029
q22.3	109,440,468	109,622,328	Ganho	2	0	181860	40,0	40,0	0,014
q22.3 - q23	109,622,328	114,643,501	Ganho	23	5	5021173	35,0	35,0	0,029
q23	114,991,626	115,531,392	Ganho	3	0	539766	35,0	35,0	0,029
q24 - q25	119,417,663	122,271,026	Ganho	71	0	2853363	35,0	35,0	0,029
q25	122,271,026	122,348,384	Ganho	1	0	77358	40,0	40,0	0,014
q25	122,348,384	122,825,940	Ganho	4	1	477556	35,0	35,0	0,029

Foi realizada uma análise supervisionada entre os casos HPV positivos e negativos e o padrão de alterações genômicas (Figura 16). O *cluster* apresentado abaixo não foi capaz de separar os casos quanto a infecção pelo HPV (positivo ou negativo). Para essa análise, foi utilizado o teste SAM, com 1.000 permutações, $P < 0,05$ e sem falso positivo (FDR=0%). Para o *cluster* dos genes significantes, foi utilizado o HCL (*Hierarchical clustering analysis*), usando correlação de *Pearson* e 1.000 permutações para classes e genes. Nessa análise não foi possível visualizar o agrupamento das amostras segundo a infecção pelo HPV.

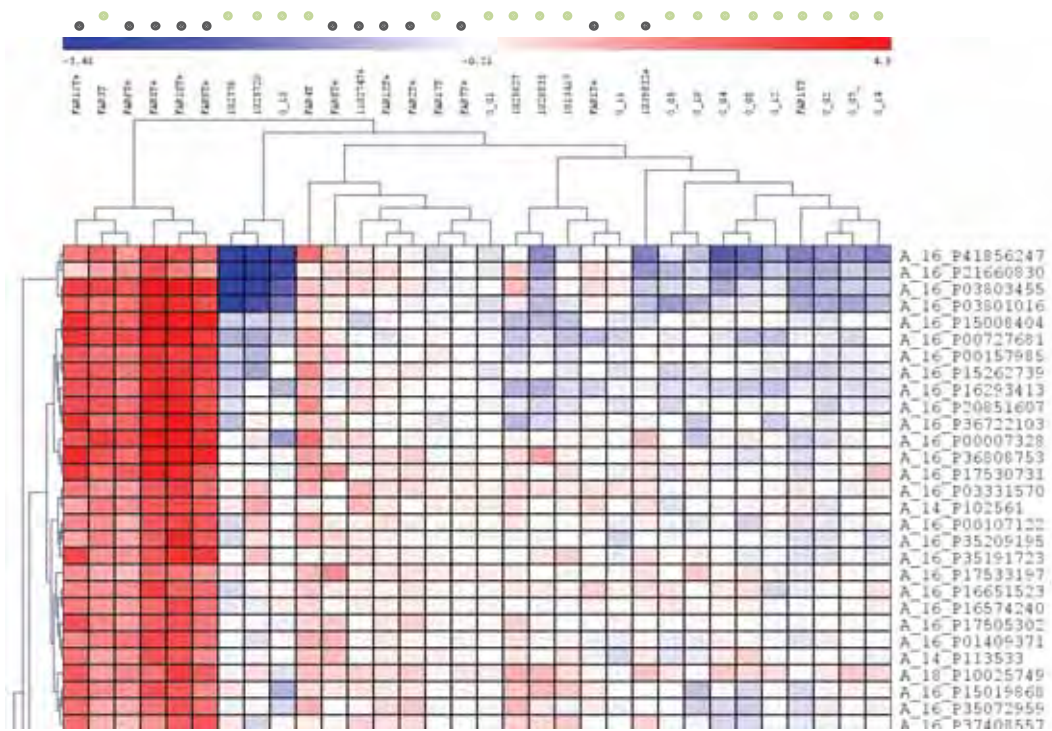


Figura 16. Clusterização hierárquica dos casos HPV positivos (cinza) e negativos (verde), (representados na horizontal acima da imagem) e os genes significantes que os diferenciam (nas linhas verticais). Em vermelho estão representadas as regiões gênicas com ganhos e em azul, as perdas. Não foi possível visualizar o agrupamento associado à infecção viral. Imagens geradas pelo programa *TMeV*.

4.3. Análise de sobrevida global

Os dados de sobrevida global dos pacientes (OS - *overall survival*, calculado como o tempo entre o diagnóstico da doença e a última informação do paciente) variou de 2 a 69 meses entre todos os pacientes avaliados por CGH-array. A análise de OS (teste de *Kaplan Meier*) foi realizada nos tumores HPV positivos e negativos, assim como os dados de resposta ao tratamento (Figura 17A e B, respectivamente).

Não foi observada uma diferença significativa de OS na análise entre os casos HPV+ e HPV- ($P > 0,05$) (Figura 17A). Porém, na comparação entre a resposta ao tratamento (Completa - RC, Parcial - RP, Doença Progressiva - DP, e sem tratamento - N) considerando os 32 casos, a OS mostrou relação significativa entre pacientes com RP e DP ($P = 0,046$) e RC e N ($P = 0,031$), demonstrando a eficácia do tratamento nos pacientes com resposta positiva (Figura 17B).

Além disso, fizemos uma análise isolada dos pacientes que receberam somente carboplatina como radioterapia associada. A relação entre os pacientes com resposta parcial e doença progressiva foi significativa ($P = 0,018$) (Figura 18).

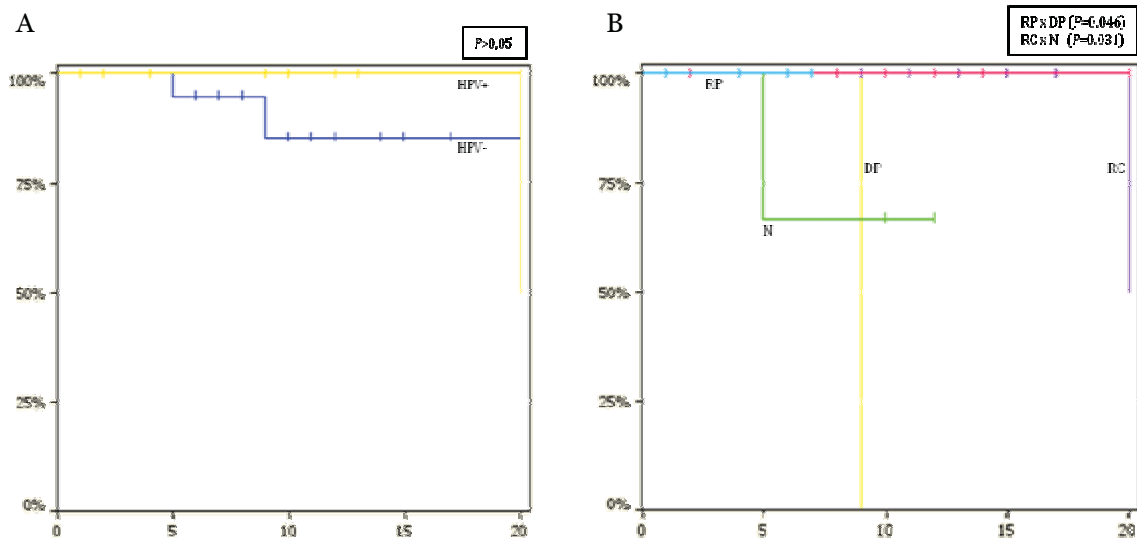


Figura 17. Curvas de *Kaplan-Meier* para a análise de sobrevida global nos pacientes com e sem infecção por HPV (A - $P > 0,05$) e sua associação com a resposta ao tratamento proposto (B - P significativos). Imagens obtidas no programa *Nexus Copy Number version 5.0*.

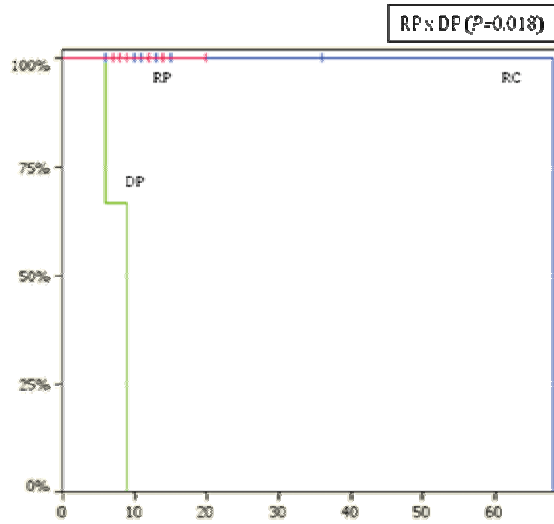


Figura 18. Curvas de *Kaplan-Meier* para a análise de sobrevida global nos pacientes tratados com radioterapia associada à carboplatina entre os pacientes com resposta completa *versus* doença progressiva ($P=0,018$). Imagens obtidas no programa *Nexus Copy Number version 5.0*.

5. Análise de expressão gênica global

Entre os 25 carcinomas de orofaringe, 22 foram avaliados quanto ao perfil de expressão gênica global. Três amostras foram descartadas devido à baixa qualidade e integridade do RNA obtido ou o tecido de biópsia não foi suficiente para extração deste ácido nucléico.

Foi utilizado RNA de referência universal assim como tecido normal de orofaringe obtidos em tonsilectomia e tecido normal adjacente ao tumor. O RNA de referência universal utilizado contém quantidades iguais de RNA total obtido de 15 diferentes linhagens celulares (Gomes *et al.*, 2005; Stolf *et al.*, 2006; Boccardo *et al.*, 2010). As amostras normais de orofaringe foram agrupadas de acordo com o sítio específico de origem, consistindo de tonsila palatina normal (*pool 1* - quatro amostras), amostras adjacentes deste mesmo sítio (*pool 2* - duas amostras) e de base de língua (*pool 3* - três amostras). Esses *pools* foram hibridados contra o RNA de referência universal na mesma plataforma 4x44K utilizada. As amostras de referência normal foram pareadas de acordo com o sítio específico de cada tumor. Esta estratégia foi utilizada para eliminar diferenças de expressão gênica que não são tecido-específicas.

Os experimentos de expressão gênica global foram realizados utilizando a plataforma 4x44K (Agilent Technologies). Todas as amostras atingiram os parâmetros de qualidade recomendados pelo fabricante (QC metrics), os quais são gerados após a avaliação do padrão de hibridação das lâminas pelo programa *Feature Extraction 10.1.1.1* (Agilent Technologies).

Após a aplicação do teste *t* estatístico (programa TMeV *version 4.5*; <http://www.tm4.org>) com FDR 5% e 1000 permutações, os genes diferencialmente expressos tiveram o *fold change* calculado e foram classificados em grupos utilizando as anotações das vias do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-KEGG* e a base de dados *Gene Ontology* (GO). Genes com *fold change* > 1,5 foram utilizados na análise de redes, vias canônicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular com a utilização do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems, Biodiscovery). Foram identificados 1937 genes diferencialmente expressos, sendo 956 com aumento e 981 com diminuição de expressão gênica (49,4% e 50,6%, respectivamente).

Os *scores* para cada item, $-\log(\text{valor de } P)$, foram calculados pelo teste exato de *Fischer*. Os genes com função não especificada ou desconhecida foram desconsiderados, restando 1463 genes diferencialmente expressos.

As principais doenças e funções moleculares e celulares relacionadas aos genes com alteração no nível de expressão estão representadas na Figura 19A. Entre elas, destacam-se o câncer, doença inflamatória e doenças genéticas como principais doenças. Além disso, as principais funções moleculares e celulares identificadas foram migração, desenvolvimento e morfologia celular.

A análise de vias canônicas foi realizada pelo programa IPA resultando na identificação de genes diferencialmente expressos presentes principalmente nas vias relacionadas à função dos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais na artrite reumatóide, sinalização na aterosclerose e sinalização de quimiocinas (Tabela 10; Figura 19B). Os *scores* das dez principais vias representadas variaram de 3,68 a 8,05.

Os maiores *folds change* detectados nos carcinomas de orofaringe incluíram os genes *TMPRSS11A* e *MAGEA9*, com diminuição de expressão e *FGF7* e *ONECUT2*, com aumento de expressão (*fold change*: -9,83, -8,83, 8,94 e 7,12, respectivamente).

A interação entre esses genes foi analisada por meio das redes gênicas, das quais destacaram-se quatro principais, envolvendo de 29 a 31 genes alvos alterados (*scores* variando de 34 a 36). Essas redes estão apresentadas na tabela 11 e representadas na figura 20.

Tabela 10. Genes diferencialmente expressos relacionados às dez principais vias canônicas conhecidas.

Via canônica	Score -log(p valor)	Genes alterados/ Genes da via (%)	Genes diferencialmente expressos
Papel dos Macrófagos, Fibroblastos e Células Endoteliais na Artrite Reumatóide	8,05	↑ 27/342 (8%) ↓ 24/342 (7%)	↑ <i>SOCS1</i> , ↑ <i>PLCB2</i> , ↑ <i>TLR8</i> , ↓ <i>IL6</i> , ↑ <i>TCF7</i> , ↑ <i>VEGFA</i> , ↓ <i>ROCK2</i> , ↑ <i>IL1R2</i> , ↑ <i>WNT7B</i> , ↓ <i>PLCB1</i> , ↑ <i>WNT4</i> , ↓ <i>PLCL1</i> , ↓ <i>PRKD3</i> , ↑ <i>SFRP4</i> , ↓ <i>IL1F6</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↓ <i>IL1F5</i> , ↑ <i>FZD5</i> , ↓ <i>PDGFD</i> , ↑ <i>ICAM1</i> , ↑ <i>FNI</i> , ↑ <i>SFRP2</i> , ↓ <i>FGF2</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↓ <i>CCL5</i> , ↑ <i>PDGFC</i> , ↓ <i>KLK11</i> , ↑ <i>ROR2</i> , ↓ <i>IL1F9</i> , ↑ <i>JUN</i> , ↑ <i>CCL2</i> , ↑ <i>TMPRSS3</i> , ↑ <i>AKT3</i> , ↓ <i>PRKCE</i> , ↑ <i>NOS2</i> , ↓ <i>FCGR3A</i> , ↓ <i>KLK10</i> , ↑ <i>PRKCA</i> , ↓ <i>CAMK2B</i> , ↑ <i>SRC</i> , ↓ <i>CALML5</i> , ↓ <i>VCAM1</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↓ <i>IL10</i> , ↑ <i>CEBPB</i> , ↓ <i>IRAK3</i> , ↓ <i>PLCB4</i> , ↓ <i>HP</i> , ↑ <i>APC2</i> , ↑ <i>CXCL12</i> , ↑ <i>LRP1</i>
Sinalização da Aterosclerose	7,28	↑ 17/114 (15%) ↓ 7/114 (6%)	↑ <i>CCR3</i> , ↓ <i>VCAM1</i> , ↑ <i>ICAM1</i> , ↑ <i>MSR1</i> , ↓ <i>IL1F6</i> , ↑ <i>COL2A1</i> , ↑ <i>PLA2G3</i> , ↓ <i>IL6</i> , ↑ <i>PDGFC</i> , ↑ <i>ALOXE3</i> , ↑ <i>PLA2G4C</i> , ↑ <i>COL1A2</i> , ↑ <i>ITGB2</i> , ↑ <i>COL1A1</i> , ↓ <i>IL1F9</i> , ↑ <i>CCL2</i> , ↑ <i>SELP</i> , ↓ <i>RNF111</i> , ↑ <i>CXCL12</i> , ↓ <i>IL1F5</i> , ↑ <i>COL10A1</i> , ↑ <i>COL18A1</i> , ↓ <i>PDGFD</i> , ↑ <i>MMP9</i>
Sinalização de Quimiocinas	6,55	↑ 11/73 (15%) ↓ 8/73 (11%)	↑ <i>SRC</i> , ↓ <i>PPP1CC</i> , ↑ <i>CCR3</i> , ↓ <i>CALML5</i> , ↑ <i>PLCB2</i> , ↓ <i>LIMK2</i> , ↓ <i>CCL5</i> , ↑ <i>MAPK13</i> , ↓ <i>ROCK2</i> , ↓ <i>PLCB4</i> , ↓ <i>CCL4</i> , ↑ <i>CCL13</i> , ↑ <i>JUN</i> , ↑ <i>CCL2</i> , ↑ <i>CXCL12</i> , ↑ <i>PPP1R12B</i> , ↓ <i>PLCB1</i> , ↑ <i>PRKCA</i> , ↓ <i>CAMK2B</i>
Sinalização da Dor Neuropática em Neurônios do Corso Dorsal	5,87	↑ 11/107 (10%) ↓ 11/107 (10%)	↓ <i>PRKACB</i> , ↑ <i>SRC</i> , ↑ <i>GRIN3B</i> , ↑ <i>PLCB2</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↑ <i>BDNF</i> , ↓ <i>GRIA2</i> , ↑ <i>PRKAR2A</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↓ <i>TAC1</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↓ <i>PLCB4</i> , ↑ <i>NTRK2</i> , ↑ <i>KCNQ2</i> , ↓ <i>PLCB1</i> , ↓ <i>PRKCE</i> , ↑ <i>KCNQ3</i> , ↓ <i>PLCL1</i> , ↓ <i>PRKD3</i> , ↑ <i>PRKCA</i> , ↓ <i>CAMK2B</i> , ↑ <i>GRIA3</i>
Fibrose Hepática / Ativação da Célula Hepática Estrelada	4,77	↑ 15/144 (10%) ↓ 9/144 (6%)	↓ <i>VCAM1</i> , ↑ <i>ICAM1</i> , ↑ <i>FNI</i> , ↑ <i>LEP</i> , ↓ <i>FGF2</i> , ↓ <i>IL10</i> , ↑ <i>FLT1</i> , ↑ <i>ACTA2</i> , ↓ <i>IL6</i> , ↓ <i>CCL5</i> , ↑ <i>PDGFC</i> , ↓ <i>SERPINB2</i> , ↑ <i>VEGFA</i> , ↑ <i>IL1R2</i> , ↑ <i>COL1A2</i> , ↑ <i>COL1A1</i> , ↑ <i>CXCL3</i> , ↑ <i>CCL2</i> , ↓ <i>CCL21</i> , ↓ <i>IGFBP3</i> , ↑ <i>MMP9</i> , ↑ <i>AGT</i> , ↑ <i>PDGFRB</i> , ↓ <i>EGFR</i>
Sinalização de Glioma	4,46	↑ 8/111 (7%) ↓ 11/111 (10%)	↑ <i>CDKN2A</i> , ↓ <i>CALML5</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↑ <i>PDGFC</i> , ↓ <i>SIN3A</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↓ <i>E2F6</i> , ↑ <i>CDKN1A</i> , ↓ <i>E2F5</i> , ↓ <i>PRKCE</i> , ↑ <i>AKT3</i> , ↓ <i>PDGFD</i> , ↓ <i>PRKD3</i> , ↑ <i>E2F2</i> , ↓ <i>EGFR</i> , ↑ <i>PRKCA</i> , ↓ <i>CAMK2B</i> , ↑ <i>PDGFRB</i>
Sinalização de Extravasão Leucocitária	4,35	↑ 22/195 (11%) ↓ 7/195 (4%)	↑ <i>CLDN11</i> , ↑ <i>SPN</i> , ↑ <i>ICAM1</i> , ↑ <i>ACTA2</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↑ <i>MAPK13</i> , ↓ <i>ROCK2</i> , ↑ <i>MMP25</i> , ↓ <i>PRKCE</i> , ↑ <i>ACTG2</i> , ↓ <i>PRKD3</i> , ↑ <i>VASP</i> , ↑ <i>PRKCA</i> , ↑ <i>SRC</i> , ↓ <i>VCAM1</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↑ <i>MMP28</i> , ↑ <i>NCF4</i> , ↑ <i>DLC1</i> , ↑ <i>MMP27</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↑ <i>ITGB2</i> , ↑ <i>CDH5</i> , ↑ <i>CLDN1</i> , ↑ <i>CXCL12</i> , ↑ <i>CD44</i> , ↑ <i>MMP9</i> , ↓ <i>CLDN3</i> , ↑ <i>CTNND1</i>
Maturação de Células Dendríticas	4,01	↑ 15/179 (8%) ↓ 9/179 (5%)	↑ <i>HLA-DMA</i> , ↑ <i>ICAM1</i> , ↑ <i>LEP</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↓ <i>IL10</i> , ↓ <i>IL1F6</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↑ <i>COL2A1</i> , ↑ <i>HLA-DRB1</i> , ↓ <i>IL6</i> , ↑ <i>MAPK13</i> , ↑ <i>TREM2</i> , ↓ <i>DDR1</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↑ <i>COL1A2</i> , ↑ <i>COL1A1</i> , ↓ <i>IL1F9</i> , ↑ <i>HLA-DRB3</i> , ↓ <i>HLA-DRB4</i> , ↓ <i>IL1F5</i> , ↑ <i>AKT3</i> , ↑ <i>COL10A1</i> , ↑ <i>COL18A1</i> , ↓ <i>FCGR3A</i>
Sinalização de IL-8	3,85	↑ 16/191 (8%) ↓ 10/191 (5%)	↑ <i>PLCB2</i> , ↑ <i>ICAM1</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↑ <i>LIMK2</i> , ↑ <i>PDGFC</i> , ↓ <i>ROCK2</i> , ↑ <i>VEGFA</i> , ↓ <i>PRKCE</i> , ↑ <i>AKT3</i> , ↓ <i>PRKD3</i> , ↓ <i>EGFR</i> , ↑ <i>PRKCA</i> , ↑ <i>SRC</i> , ↓ <i>VCAM1</i> , ↑ <i>NOX4</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↑ <i>FLT1</i> , ↑ <i>RHOJ</i> , ↓ <i>IRAK3</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↑ <i>ITGB2</i> , ↓ <i>RHOV</i> , ↑ <i>CDH1</i> , ↓ <i>CCND3</i> , ↑ <i>PTGS2</i> , ↑ <i>MMP9</i>
Sinalização de Glioblastoma Multiforme	3,68	↑ 13/163 (8%) ↓ 10/163 (6%)	↑ <i>CDKN2A</i> , ↑ <i>SRC</i> , ↑ <i>PLCB2</i> , ↓ <i>PIK3C2A</i> , ↑ <i>PIK3R5</i> , ↑ <i>RHOJ</i> , ↑ <i>PDGFC</i> , ↓ <i>PIK3R3</i> , ↓ <i>E2F6</i> , ↓ <i>RHOV</i> , ↓ <i>PLCB4</i> , ↑ <i>WNT7B</i> , ↑ <i>CDKN1A</i> , ↓ <i>E2F5</i> , ↑ <i>WNT4</i> , ↓ <i>PLCB1</i> , ↑ <i>AKT3</i> , ↑ <i>FZD5</i> , ↓ <i>PDGFD</i> , ↓ <i>PLCL1</i> , ↓ <i>E2F2</i> , ↓ <i>EGFR</i> , ↑ <i>PDGFRB</i>

(*): aumento de expressão gênica ↑; diminuição de expressão gênica ↓.



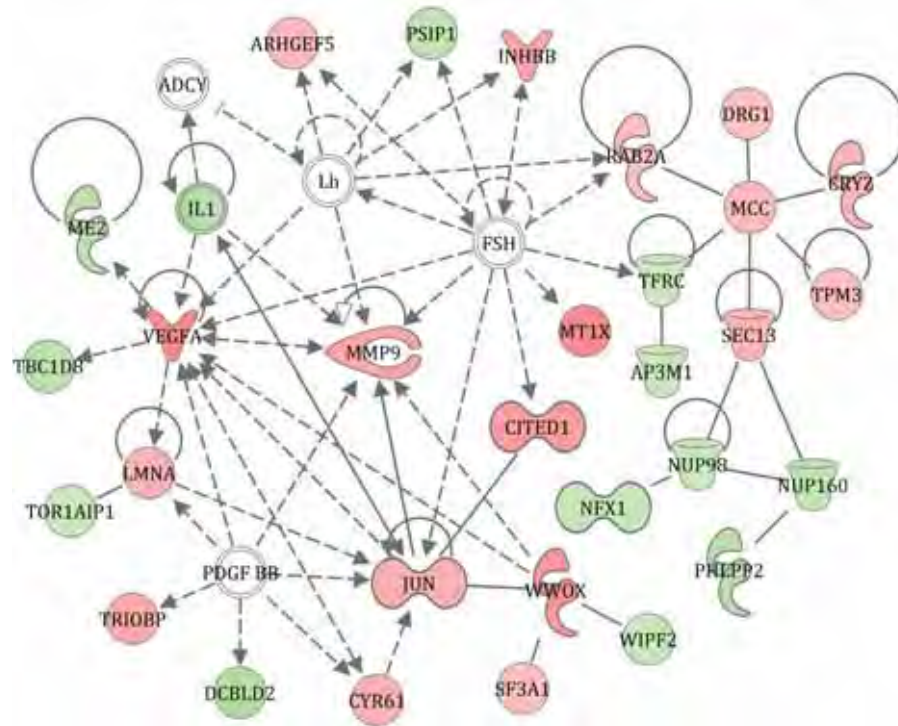
Figura 19. Principais doenças, funções moleculares e celulares (A) e vias canônicas (B) com participação dos genes diferencialmente expressos (em porcentagem) nos carcinomas de orofaringe. Os scores, $-\log(\text{valor de } P)$, são calculados pelo teste exato de *Fischer*. Imagens geradas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Tabela 11. Genes diferencialmente expressos relacionados com as principais redes biológicas.

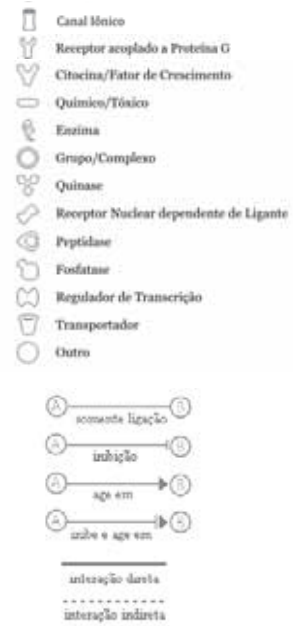
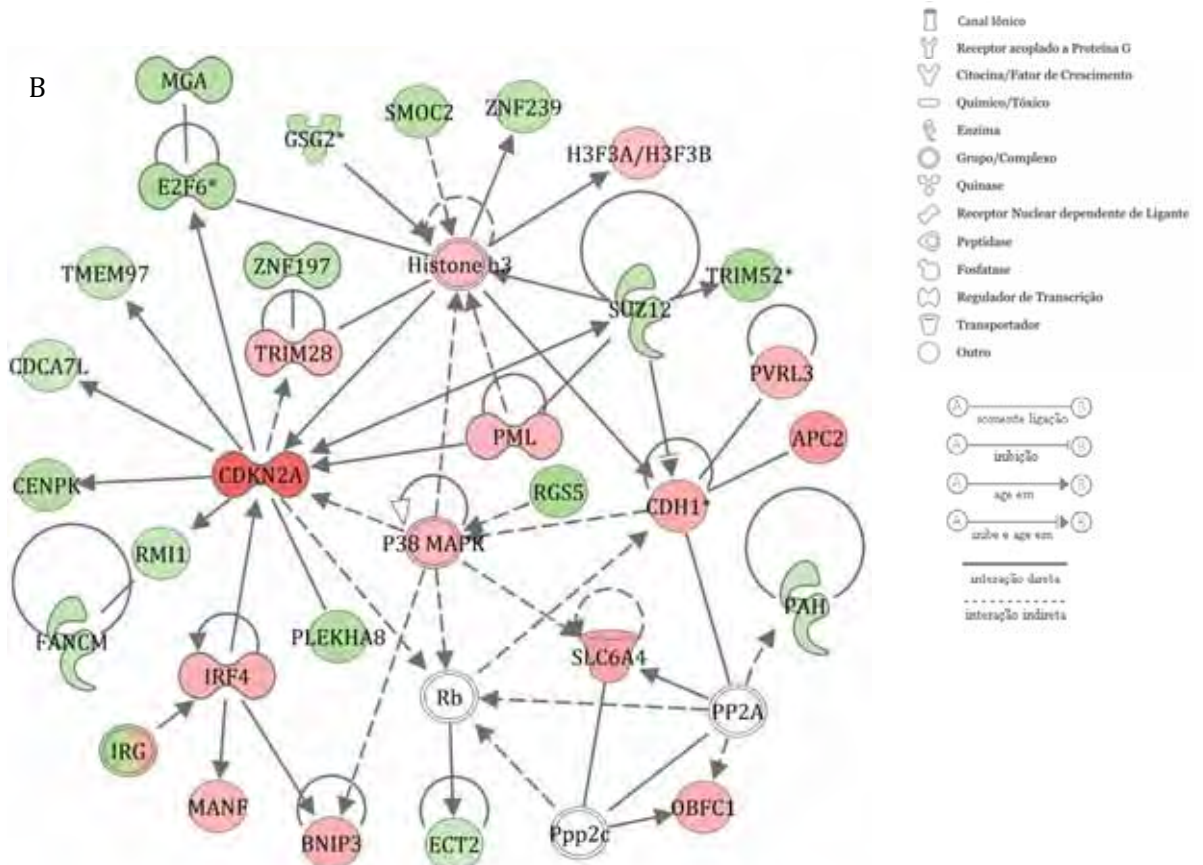
Rede	Funções Principais	Score	Genes alvo	Moléculas participantes das redes(*)
1	Doença Imunológica, Desenvolvimento e Função do Sistema Cardiovascular, Desenvolvimento de órgãos	36	30	<i>ADCY</i> , ↓ <i>AP3M1</i> , ↑ <i>ARHGEF5</i> , ↑ <i>CITED1</i> , ↑ <i>CRYZ</i> , ↑ <i>CYR61</i> , ↓ <i>DCBLD2</i> , ↑ <i>DRG1</i> , <i>FSH</i> , <i>IL1</i> , ↑ <i>INHBB</i> , ↑ <i>JUN</i> , <i>Lh</i> , ↑ <i>LMNA</i> , ↑ <i>MCC</i> , ↓ <i>ME2</i> , ↑ <i>MMP9</i> , ↑ <i>MT1X</i> , ↓ <i>NFX1</i> , ↓ <i>NUP98</i> , ↓ <i>NUP160</i> , <i>PDGF BB</i> , ↓ <i>PHLPP2</i> , ↓ <i>PSIP1</i> , ↑ <i>RAB2A</i> , ↑ <i>SEC13</i> , ↑ <i>SF3A1</i> , ↓ <i>TBC1D8</i> , ↓ <i>TFRC</i> , ↓ <i>TOR1AIP1</i> , ↑ <i>TPM3</i> , ↑ <i>TRIOBP</i> , ↑ <i>VEGFA</i> , ↓ <i>WIPF2</i> , ↑ <i>WVOX</i>
2	Câncer, Doença Genética e Ciclo Celular	34	29	↑ <i>APC2</i> , ↑ <i>BNIP3</i> , ↓ <i>CDCA7L</i> , ↑ <i>CDH1</i> , ↑ <i>CDKN2A</i> , ↓ <i>CENPK</i> , ↓ <i>E2F6</i> , ↓ <i>ECT2</i> , ↓ <i>FANCM</i> , ↓ <i>GSG2</i> , ↑ <i>H3F3A/H3F3B</i> , <i>Histona h3</i> , ↑ <i>IRF4</i> , <i>IRG</i> , ↑ <i>MANF</i> , ↓ <i>MGA</i> , ↑ <i>OBFC1</i> , <i>P38 MAPK</i> , ↓ <i>PAH</i> , ↓ <i>PLEKHA8</i> , ↑ <i>PML</i> , <i>PP2A</i> , <i>Ppp2c</i> , ↑ <i>PVRL3</i> , <i>Rb</i> , ↓ <i>RGS5</i> , ↓ <i>RMI1</i> , ↑ <i>SLC6A4</i> , ↓ <i>SMOC2</i> , ↓ <i>SUZ12</i> , ↓ <i>TMEM97</i> , ↑ <i>TRIM28</i> , ↓ <i>TRIM52</i> , ↓ <i>ZNF197</i> , ↓ <i>ZNF239</i>
3	Morte Celular, Expressão Gênica e Mecanismo de Infecção	34	30	↓ <i>ABCE1</i> , ↑ <i>ALOX5AP</i> , ↑ <i>AMICA1</i> , ↑ <i>AR</i> , ↑ <i>ATXN1</i> , <i>Caspase</i> , ↑ <i>CDK11A/CDK11B</i> , ↑ <i>CEBPB</i> , ↑ <i>CKAP4</i> , ↑ <i>CTSW</i> , ↑ <i>CXCR5</i> , ↓ <i>CYCS</i> , <i>DDX56</i> , ↑ <i>DHRS2</i> , ↑ <i>ENTPD6</i> , ↓ <i>FKBP1A</i> , ↑ <i>GAPDH</i> , ↓ <i>GLMN</i> , ↑ <i>HIVEP3</i> , <i>Hsp70</i> , <i>Hsp90</i> , ↑ <i>IL2</i> , <i>MHC Class I (complexo)</i> , ↓ <i>MOAP1</i> , ↓ <i>NROB1</i> , ↑ <i>PITX1</i> , ↑ <i>PLEKHA5</i> , ↑ <i>PLEKHA6</i> , <i>RNase A</i> , ↓ <i>SIN3A</i> , ↓ <i>SUGP2</i> , ↑ <i>VDAC3</i> , ↓ <i>WHSC1</i> , ↑ <i>ZC3H10</i> , ↓ <i>ZNF276</i>
4	Morfologia da Célula, Crescimento e Proliferação Celular, Desenvolvimento e Função do Sistema Esquelético e Muscular	34	31	↑ <i>AGT</i> , <i>fosfotransferase acetadora de grupo álcool</i> , ↑ <i>ANGPTL4</i> , ↑ <i>ANXA3</i> , ↑ <i>BDNF</i> , ↓ <i>C14orf106</i> , ↑ <i>CD44</i> , ↑ <i>CDKN1A</i> , ↑ <i>CEP55</i> , ↓ <i>CLCA2</i> , <i>Receptor de Estrógeno</i> , ↓ <i>FAM81A</i> , ↑ <i>FBLN2</i> , ↑ <i>FN1</i> , ↓ <i>GNPDA2</i> , ↑ <i>HIST1H3A (entre outros)</i> , ↑ <i>HTRA1</i> , ↓ <i>IFT52</i> , ↓ <i>IGKV1-5</i> , ↓ <i>JTB</i> , ↑ <i>KCND3</i> , ↓ <i>LASS2</i> , ↑ <i>LRRCSA</i> , ↑ <i>LSS</i> , ↑ <i>LUM</i> , ↑ <i>MAGEA2/MAGEA2B</i> , ↑ <i>MAP3K6</i> , <i>MIR1</i> , ↑ <i>NOS3</i> , ↑ <i>PLXNA2</i> , ↓ <i>PRAME</i> , ↓ <i>PRKCE</i> , ↑ <i>UBE2S</i> , ↓ <i>UST</i> , <i>Vegf</i>

(*): aumento de expressão gênica ↑; diminuição de expressão gênica ↓.

A



B



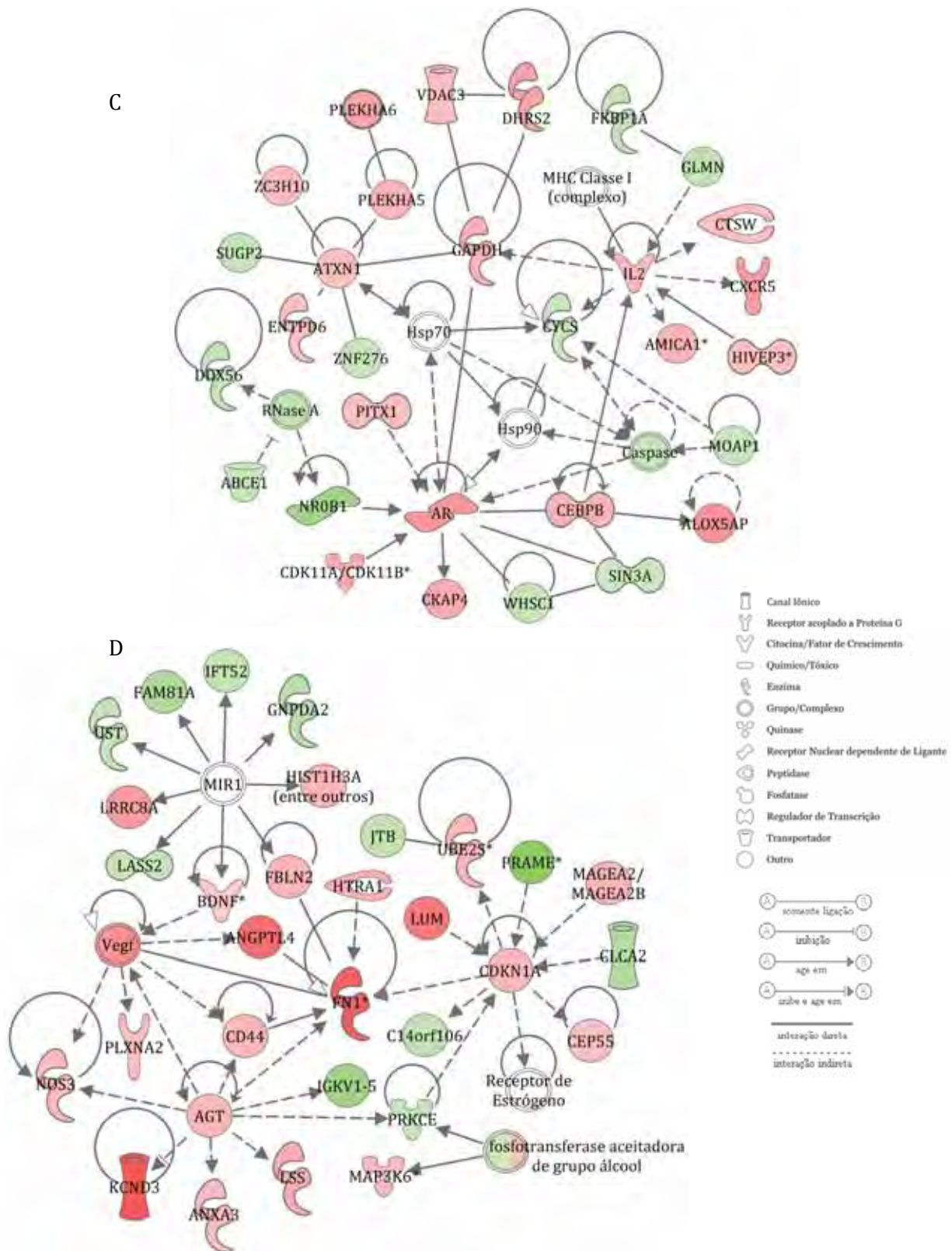


Figura 20. Representação esquemática das quatro principais redes biológicas que envolvem genes diferencialmente expressos em CEC de orofaringe. Funções principais (A) doenças imunológicas, desenvolvimento e função do sistema cardiovascular, desenvolvimento de órgãos; (B) Câncer, doença genética e ciclo celular; (C) Morte celular, controle da expressão gênica e mecanismo de infecção e (D) Morfologia celular, crescimento e proliferação celular e desenvolvimento e função do sistema esquelético e muscular. Em vermelho, genes com aumento de expressão e verde, diminuição. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

5.1. Influência do HPV no perfil de expressão gênica

A análise de agrupamento hierárquico foi realizada utilizando o programa TMeV *version 4.5* (<http://www.tm4.org>). O agrupamento hierárquico não supervisionado não foi capaz de separar os casos quanto ao padrão de expressão gênica. Contudo, na análise de agrupamento supervisionado quanto ao padrão de infecção pelo HPV (9 casos positivos *versus* 13 casos negativos), 104 genes apresentavam-se com expressão diferencial entre os dois grupos, sendo 58 genes com expressão aumentada e 46 genes com expressão diminuída nos tumores HPV + comparados aos HPV -, com valores de *fold change* variando de -7,61 a 3,26 (Figura 21). Entre estes, 54 genes apresentaram função conhecida nos bancos de dados públicos (Tabela 12).

Os valores de *fold change*, nesse caso, representam a relação entre os genes alterados nos casos com e sem infecção por HPV. Os valores negativos representam os genes com diminuição de expressão preferencial ou exclusiva dos casos HPV positivos, enquanto os valores positivos de *fold change* representam os genes com aumento de expressão ou com diminuição de expressão menor que nos casos HPV negativos. Quanto maior o número bruto do *fold change*, maior a divergência entre os valores de expressão dos grupos e mais diferencialmente expresso é um gene comparado à infecção por HPV.

Da mesma forma, os genes diferencialmente expressos foram utilizados para análise de redes e vias canônicas e classificados quanto às principais doenças, funções moleculares e celulares de acordo com a presença ou ausência de HPV (Figura 22A). Foi observado um grande número de moléculas alteradas envolvidas no mecanismo de duplicação, recombinação e reparo do DNA e câncer, sendo o transporte molecular e o tráfego protéico as funções moleculares e celulares predominantes.

Os genes com maiores *scores* de *fold change* e que mostraram associação com processos tumorais foram *PARK7* (1,47), *LARP7* (1,56), *VIM* (3,12), *KRAS* (-1,63).

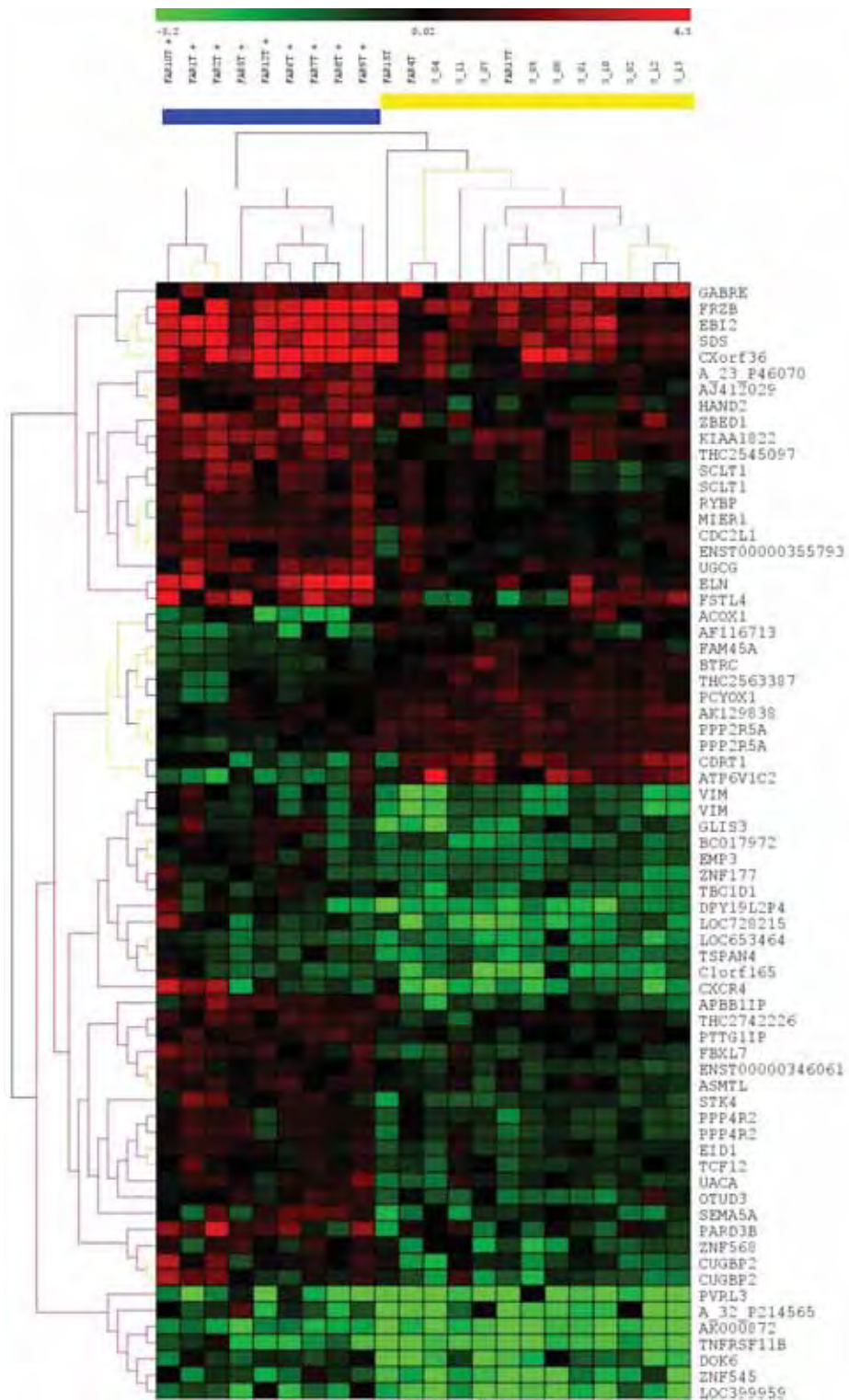


Figura 21. Agrupamento hierárquico supervisionado realizado nos CECs de orofaringe segundo a presença (9 casos) ou ausência de infecção pelo HPV (13 casos). Observa-se o agrupamento de 100% dos casos positivos (azul) e negativos (amarelo). Genes com aumento de expressão estão representados com a cor vermelha, diminuição de expressão gênica com a cor verde e genes inalterados em preto.

Tabela 12. Genes diferencialmente expressos com função conhecida identificados após análise de agrupamento hierárquico supervisionado segundo a presença ou ausência de infecção por HPV.

Símbolo	Nome (Entrez Gene)	Média HPV+	Média HPV-	Fold Change (*)	Função molecular (IPA)
<i>ABCB10</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10</i>	-1,13	-0,38	-1,68	Transportador
<i>ACOX1</i>	<i>acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein</i>	-1,22	0,34	-2,94	Enzima
<i>APBB1IP</i>		0,84	-0,74	2,99	Outro
<i>ASMTL</i>	<i>acetylserotonin O-methyltransferase-like ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2</i>	0,67	-0,19	1,80	Enzima
<i>ATP6V1C2</i>		-1,01	1,58	-6,02	Transportador
<i>MDH2</i>	<i>malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)</i>	-0,64	0,49	-2,19	Enzima
<i>TGFB3</i>	<i>transforming growth factor, beta 3</i>	1,15	0,16	1,99	Fator de Crescimento
<i>BTRC</i>	<i>beta-transducin repeat containing</i>	-0,51	0,63	-2,19	Enzima
<i>BEND5</i>	<i>BEN domain containing 5 calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma</i>	-0,68	-1,99	2,49	Outro
<i>CAMK2G</i>		-0,51	0,07	-1,49	Quinase
<i>CDK20</i>	<i>cyclin-dependent kinase 20</i>	-0,25	-1,12	1,83	Quinase
<i>CD99</i>	<i>CD99 molecule</i>	0,41	-0,50	1,87	Outro
<i>CNOT6L</i>	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like</i>	1,36	0,51	1,80	Outro
<i>CRKL</i>	<i>v-erk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i>	-0,06	0,84	-1,86	Quinase
<i>CELF2</i>	<i>CUGBP, Elav-like family member 2</i>	0,76	-0,87	3,10	Outro
<i>DDX3X</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked</i>	1,06	0,03	2,04	Enzima
<i>DLST</i>	<i>dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)</i>	-2,09	-0,65	-2,71	Enzima
<i>DMXL1</i>	<i>Dmx-like 1</i>	-1,00	0,46	-2,76	Outro
<i>DOK6</i>	<i>docking protein 6</i>	-0,63	-2,33	3,26	Outro
<i>EMP3</i>	<i>epithelial membrane protein 3</i>	-0,13	-1,12	1,99	Outro
<i>F11R</i>	<i>F11 receptor</i>	1,37	2,42	-2,07	Outro
<i>F9</i>	<i>coagulation factor IX family with sequence similarity 45, member A</i>	0,43	-0,19	1,54	Peptidase
<i>FAM45A</i>		-0,57	0,33	-1,75	Outro
<i>KCMF1</i>	<i>potassium channel modulatory factor 1</i>	-0,24	0,21	-1,37	Enzima
<i>KCTD4</i>	<i>potassium channel tetramerisation domain containing 4</i>	-0,57	0,82	-2,63	Canal Iônico
<i>KRAS</i>	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	-0,90	-0,19	-1,63	Enzima
<i>LARP7</i>	<i>La ribonucleoprotein domain family, member 7</i>	0,73	0,08	1,56	Outro

<i>LRPPRC</i>	<i>leucine-rich PPR-motif containing microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma</i>	-1,05	-0,40	-1,57	Outro
<i>MAP1LC3C</i>	<i>mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)</i>	0,87	-0,05	1,89	Outro
<i>MIER1</i>	<i>Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7</i>	1,00	0,17	1,77	Outro
<i>PARK7</i>		-0,46	-1,02	1,47	Outro
<i>PCSK1</i>	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 1</i>	-2,09	-0,31	-3,45	Peptidase
<i>PEX14</i>	<i>peroxisomal biogenesis factor 14</i>	0,38	0,07	1,25	Regulador de transcrição
<i>PHF1</i>	<i>PHD finger protein 1</i>	0,82	0,18	1,57	Regulador de transcrição
<i>PPP2R5A</i>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha</i>	0,12	1,02	-1,95	Fosfatase
<i>PPP4R2</i>	<i>protein phosphatase 4, regulatory subunit 2</i>	0,51	-0,63	2,13	Outro
<i>PTCD3</i>	<i>Pentatricopeptide repeat domain 3 pituitary tumor-transforming 1 interacting protein</i>	-0,92	-0,40	-1,43	Outro
<i>PTTG1IP</i>		0,69	-0,13	1,63	Outro
<i>RYBP</i>	<i>RING1 and YY1 binding protein</i>	1,24	0,24	2,00	Regulador de transcrição
<i>SCLT1</i>	<i>sodium channel and clathrin linker 1</i>	1,12	0,02	2,43	Transportador
<i>SEC23IP</i>	<i>SEC23 interacting protein</i>	-0,97	-0,06	-1,88	Outro
<i>STK4</i>	<i>serine/threonine kinase 4</i>	0,54	-0,73	2,41	Quinase
<i>TBC1D1</i>	<i>TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1</i>	-0,14	-1,24	2,14	Outro
<i>TBC1D5</i>	<i>TBC1 domain family, member 5</i>	-0,17	-0,80	1,55	Outro
<i>TCF12</i>	<i>transcription factor 12</i>	0,48	-0,54	2,03	Regulador de transcrição
<i>TMEM117</i>	<i>transmembrane protein 117</i>	0,82	1,91	-2,12	Outro
<i>TNFRSF11B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b</i>	-1,57	-3,25	3,20	Receptor de Transmembrana
<i>TRIM7</i>	<i>tripartite motif-containing 7</i>	0,12	0,94	-1,77	Outro
<i>UCP2</i>	<i>uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)</i>	-0,38	-1,33	1,93	Transportador
<i>VIM</i>	<i>vimentin</i>	-0,06	-1,70	3,12	Outro
<i>VPS33B</i>	<i>vacuolar protein sorting 33 homolog B (yeast)</i>	-1,10	-0,46	-1,55	Transportador
<i>VPS8</i>	<i>vacuolar protein sorting 8 homolog (S. cerevisiae)</i>	-0,12	0,40	-1,43	Outro
<i>ZBED1</i>	<i>zinc finger, BED-type containing 1</i>	2,42	0,80	3,06	Enzima
<i>ZNF273</i>	<i>zinc finger protein 273</i>	-1,08	0,08	-2,23	Outro

Fold change (*): razão entre a média do grupo HPV positivo versus o grupo HPV negativo; **Média HPV+ e HPV-:** valores negativos representam a diminuição de expressão e positivos, o aumento de expressão.

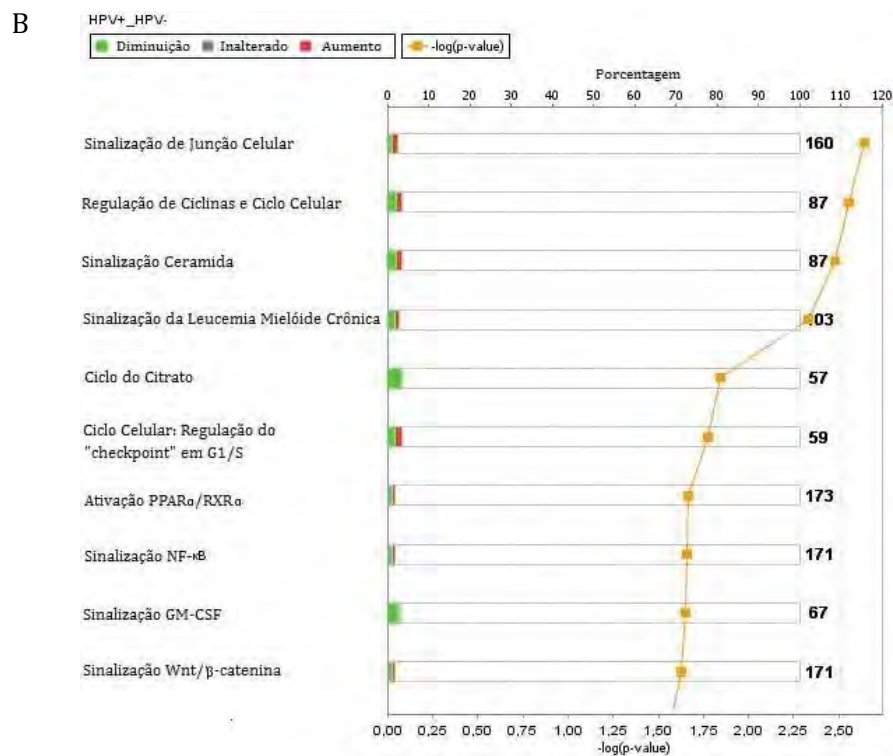
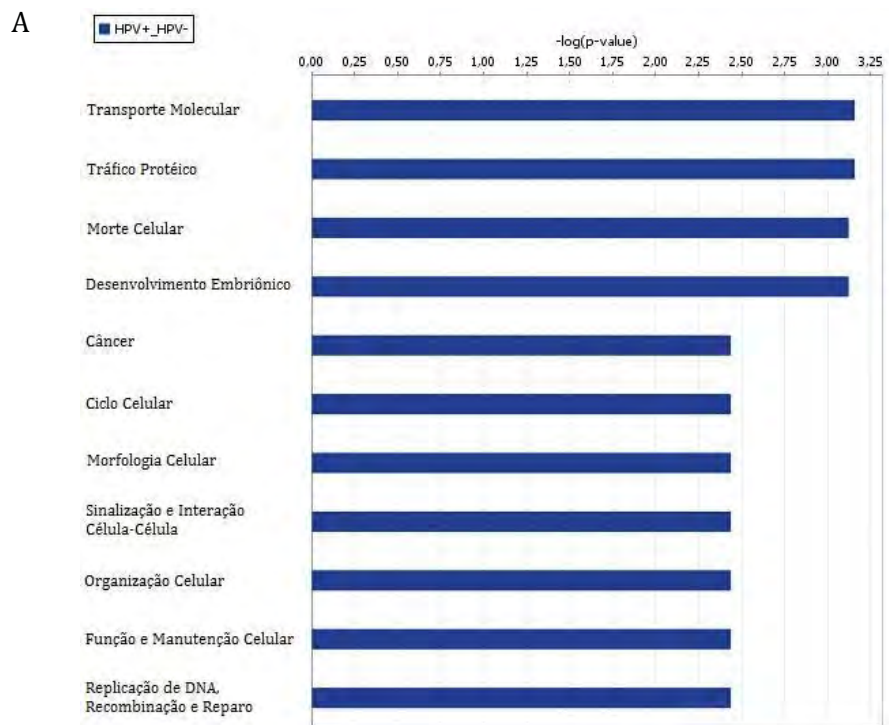


Figura 22. Principais doenças, funções moleculares e celulares (A) e vias canônicas (B) com participação dos genes diferencialmente expressos (em porcentagem) nos casos HPV+ comparados aos HPV-. Os scores para função celular e vias canônicas são calculados pelo teste exato de *Fischer* e são iguais a $-\log(\text{valor de } P)$. Imagens geradas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Os genes diferencialmente expressos que participam das vias canônicas previamente descritas estão representados na tabela 13. Os scores das principais vias representadas variaram de 1,63 a 2,64 (Figura 22B).

Tabela 13. Genes diferencialmente expressos relacionados com as vias canônicas conhecidas e o score apresentado entre os carcinomas de orofaringe HPV+ e HPV-.

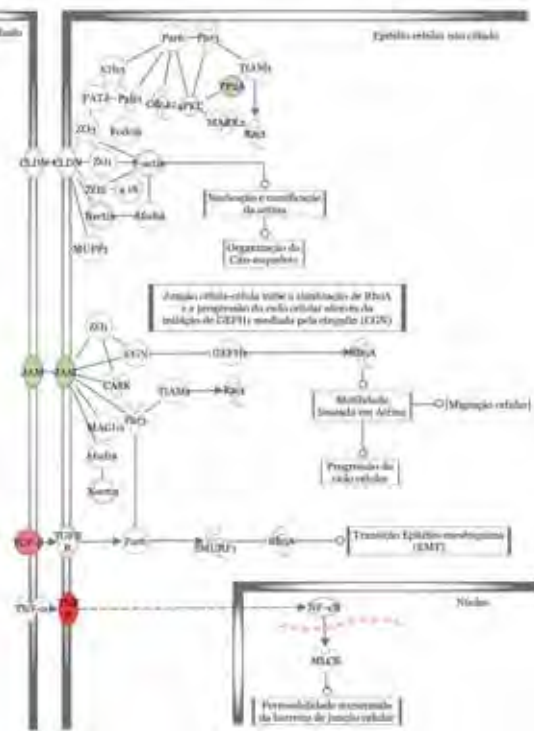
Via canônica	Score -log(p valor)	Genes alterados (*)
Sinalização de Junção Celular	2,64	↓ <i>F11R</i> , ↑ <i>TGFB3</i> , ↓ <i>PPP2R5A</i> , ↑ <i>TNFRSF11B</i>
Regulação de Ciclinas e Ciclo Celular	2,55	↑ <i>TGFB3</i> , ↓ <i>BTRC</i> , ↓ <i>PPP2R5A</i>
Sinalização Ceramida	2,47	↓ <i>KRAS</i> , ↓ <i>PPP2R5A</i> , ↑ <i>TNFRSF11B</i>
Sinalização da Leucemia Mielóide Crônica	2,33	↓ <i>CRKL</i> , ↑ <i>TGFB3</i> , ↓ <i>KRAS</i>
Ciclo de Citrato	1,84	↓ <i>DLST</i> , ↓ <i>MDH2</i>
Ciclo Celular: Regulação do "checkpoint" em G1/S	1,78	↑ <i>TGFB3</i> , ↓ <i>BTRC</i>
Ativação de PPARα/RXRα	1,67	↓ <i>ACOX1</i> , ↑ <i>TGFB3</i> , ↓ <i>KRAS</i>
Sinalização NF-κβ	1,66	↓ <i>BTRC</i> , ↓ <i>KRAS</i> , ↑ <i>TNFRSF11B</i>
Sinalização GM-CSF	1,65	↓ <i>KRAS</i> , ↓ <i>CAMK2G</i>
Sinalização Wnt/β-catenina	1,63	↑ <i>TGFB3</i> , ↓ <i>BTRC</i> , ↓ <i>PPP2R5A</i>

(*): aumento de expressão gênica ↑; diminuição de expressão gênica ↓.

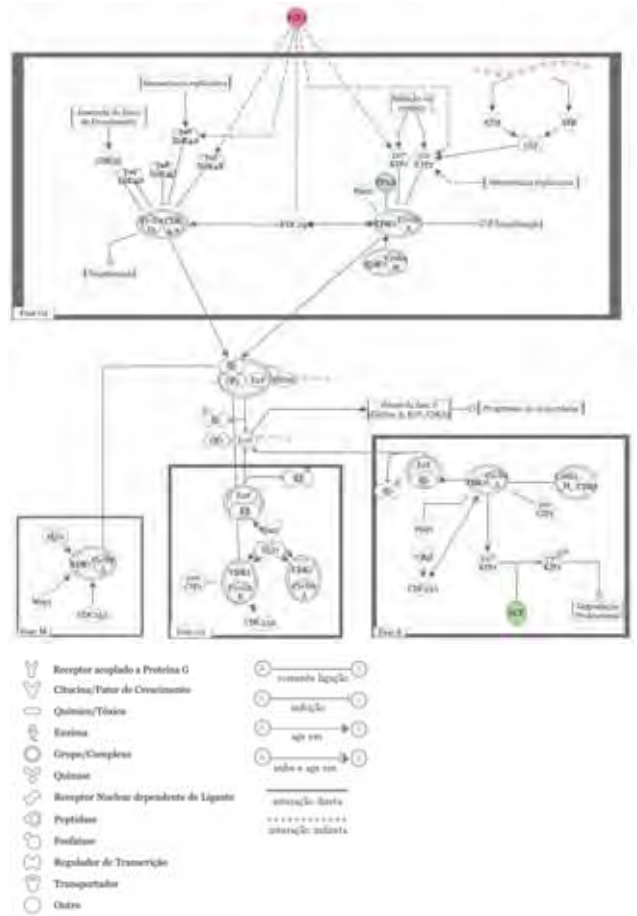
A via de sinalização de junção celular apresentou o maior score na análise de vias canônicas, seguido das vias de regulação de ciclinas e ciclo celular, sinalização ceramida e sinalização da leucemia mielóide crônica. Dentre essas vias, os genes que se apresentaram na maioria delas foi o *KRAS* e *PPP2R5A* com diminuição de expressão e *TGFB3* e *TNFRSF11B*, com aumento de expressão. As representações esquemáticas das principais vias, incluindo seus genes alterados, estão apresentados na figura 23.

A interação entre esses genes foi analisada por meio das redes gênicas, das quais destacaram-se quatro redes principais, envolvendo de 14 a 6 genes alvos alterados e scores 29, 27, 24 e 10, respectivamente. Essas redes estão descritas na tabela 14 e representadas na figura 24.

A



B



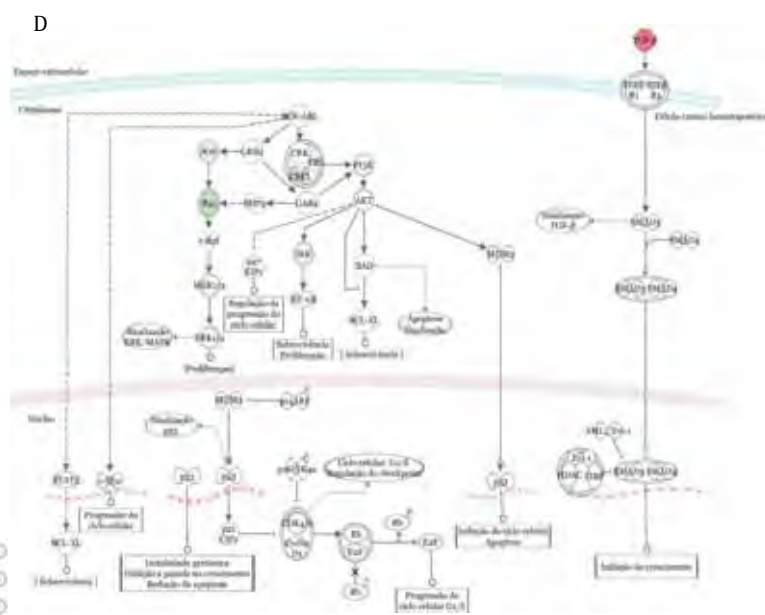
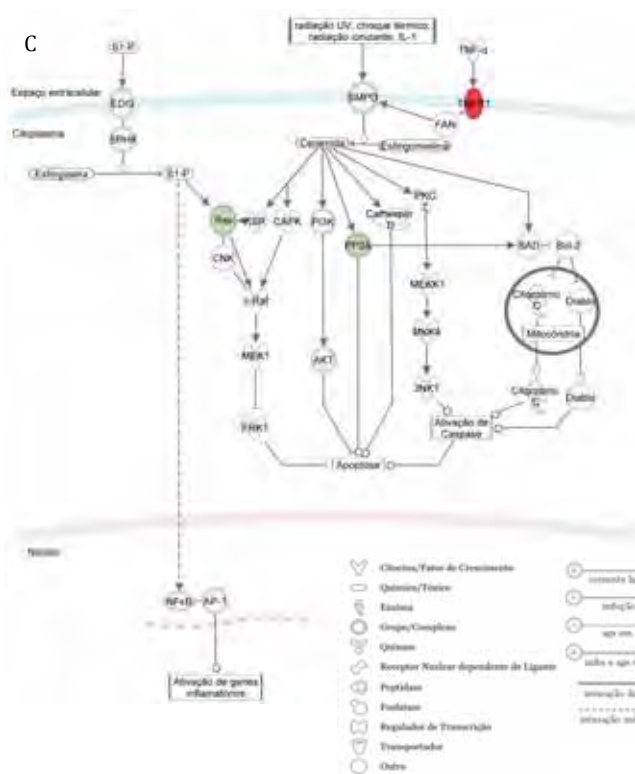


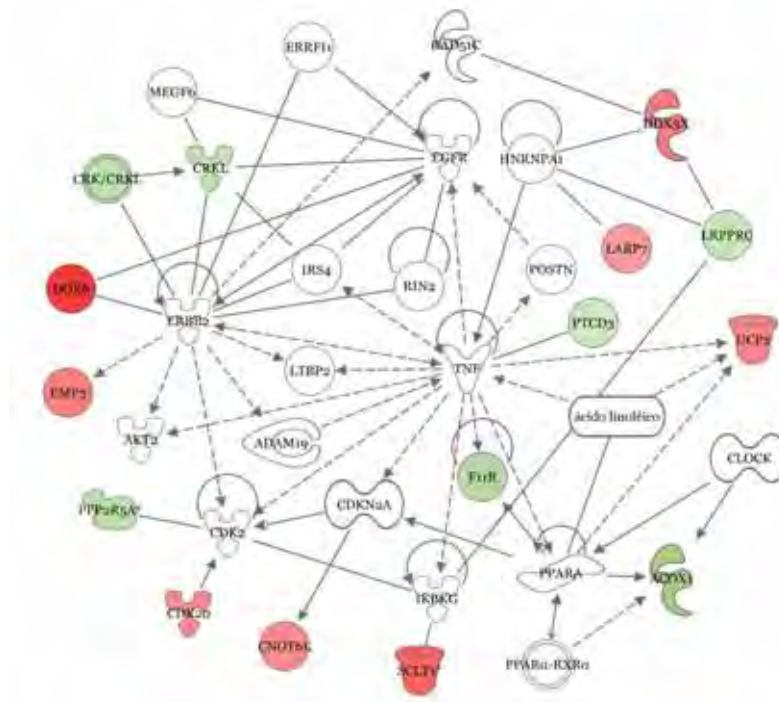
Figura 23. Representação esquemática das quatro principais vias canônicas para casos HPV+ quando comparados a HPV-. (A) Via de sinalização de junção celular; (B) Via de regulação de ciclinas e do ciclo celular; (C) Sinalização da ceramida e (D) Sinalização da leucemia mielóide crônica. Em vermelho, genes com aumento de expressão e verde, diminuição. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Tabela 14. Genes diferencialmente expressos relacionados com as principais redes biológicas conhecidas e o score apresentado pra cada uma delas entre os casos de carcinomas de orofaringe HPV+ e HPV-.

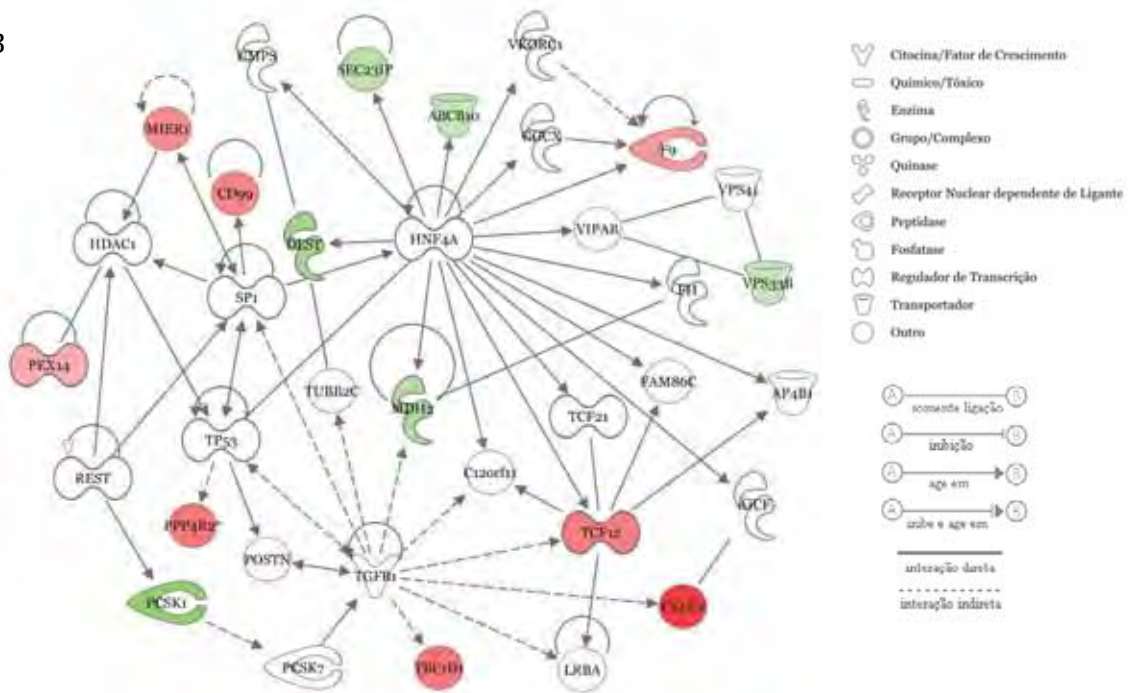
Rede	Funções	Score	Genes alvo	Moléculas participantes das redes (*)
1	Morfologia tumoral, desenvolvimento e crescimento celular e proliferação	29	14	↓ ACOX1 , <i>ADAM19</i> , <i>AKT2</i> , <i>CDK2</i> , ↑ CDK20 , <i>CDKN2A</i> , <i>CLOCK</i> , ↑ CNOT6L , <i>CRK/CRKL</i> , ↓ CRKL , ↑ DDX3X , ↑ DOK6 , <i>EGFR</i> , ↑ EMP3 , <i>ERBB2</i> , <i>ERRFI1</i> , ↓ F11R , <i>HNRNPA1</i> , <i>IKBKKG</i> , <i>IRS4</i> , ↑ LARP7 , ácido linoléico, ↓ LRPPRC , <i>LTBP2</i> , <i>MEGF6</i> , <i>POSTN</i> , <i>PPARA</i> , <i>PPARα-RXRα</i> , ↓ PPP2R5A , ↓ PTCD3 , <i>RAD51C</i> , <i>RIN2</i> , ↑ SCLT1 , <i>TNF</i> , ↑ UCP2
2	Regulação da expressão gênica, doenças genéticas e doenças hematológicas	27	14	<i>A1CF</i> , ↓ ABCB10 , <i>AP4B1</i> , <i>C12orf11</i> , ↑ CD99 , ↑ CELF2 , ↓ DLST , ↑ F9 , <i>FAM86C</i> , <i>FH</i> , <i>GGCX</i> , <i>HDAC1</i> , <i>HNF4A</i> , <i>LRBA</i> , ↓ MDH2 , ↑ MIER1 , ↓ PCSK1 , <i>PCSK7</i> , ↑ PEX14 , <i>POSTN</i> , ↑ PPP4R2 , <i>REST</i> , ↓ SEC23IP , <i>SP1</i> , ↑ TBC1D1 , ↑ TCF12 , <i>TCF21</i> , <i>TGFB1</i> , <i>TP53</i> , <i>TUBB2C</i> , <i>UMPS</i> , <i>VIPAR</i> , <i>VKORC1</i> , <i>VPS41</i> , ↓ VPS33B
3	Desenvolvimento e função dos tecidos conjuntivos e dos sistemas esqueléticos e muscular e desenvolvimento de tecidos	24	12	<i>Akt</i> , <i>AP-3</i> , ↑ APBB1IP , ↓ BTRC , ↓ CAMK2G , <i>Catepsina</i> , ↓ DMXL1 , <i>EPAS1</i> , <i>ERK1/2</i> , ↓ F11R , <i>FEZF1</i> , <i>FSH</i> , <i>HIVEP1</i> , <i>HNRNPAB</i> , <i>HSF4</i> , ↓ KRAS , <i>LTBP2</i> , <i>LTBP4</i> , <i>MUC4</i> , <i>NEFL</i> , <i>NFκB</i> (complexo), ↑ PARK7 , <i>PDGF-AA</i> , <i>RASSF2</i> , <i>RASSF4</i> , <i>SIRT6</i> , <i>SLC12A6</i> , ↑ STK4 , <i>Tgf beta</i> , ↑ TGFB3 , <i>TNFRSF11A</i> , ↑ TNFRSF11B , <i>UPP1</i> , ↑ VIM , ↑ ZBED1
4	Câncer, doenças esqueléticas e musculares e desenvolvimento de tecidos	10	6	<i>ASXL1</i> , <i>ASXL2</i> , <i>ASXL3</i> , <i>ATXN1</i> , <i>BCOR</i> , ↑ BEND5 , <i>BMI1</i> , <i>CBX2</i> , <i>CBX4</i> , <i>CBX8</i> , <i>DEDD</i> , <i>E2F6</i> , <i>EED</i> , ↓ FAM45A , ↑ MAP1LC3C , <i>MYT1</i> , <i>PCGF1</i> , <i>PCGF2</i> , <i>PCGF6</i> , <i>PHC1</i> , <i>PHC2</i> , <i>PHC3</i> , ↑ PHF1 , <i>PHF19</i> , <i>PIK3C3</i> , <i>RBPMS</i> , <i>RING1</i> , <i>RNF2</i> , ↑ RYBP , ↑ TBC1D5 , <i>USP2</i> , <i>USP7</i> , <i>USP11</i> , <i>USP19</i> , <i>YAF2</i>

(*): aumento de expressão gênica ↑; diminuição de expressão gênica ↓.

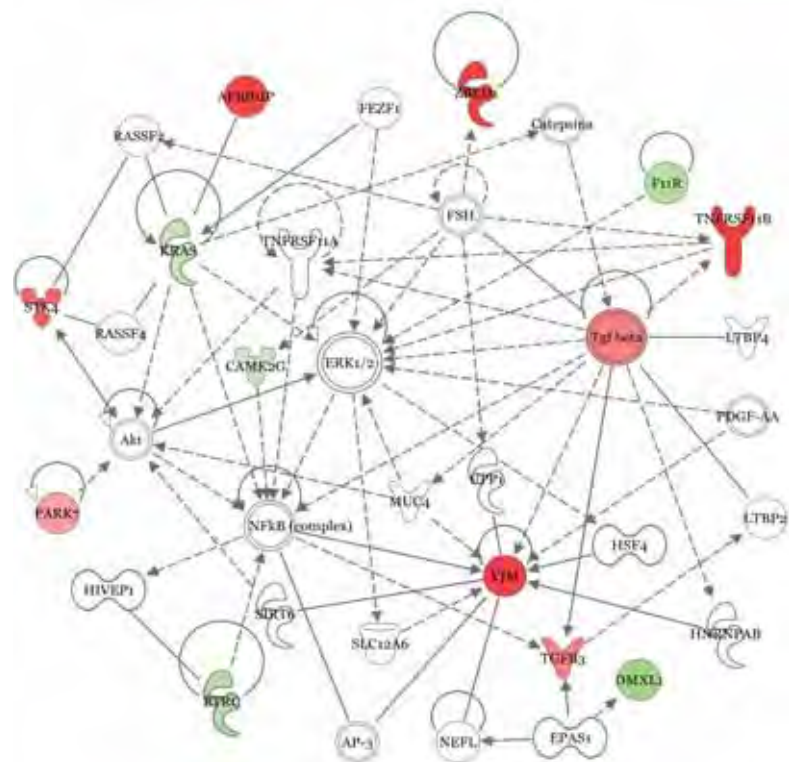
A



B



C



D

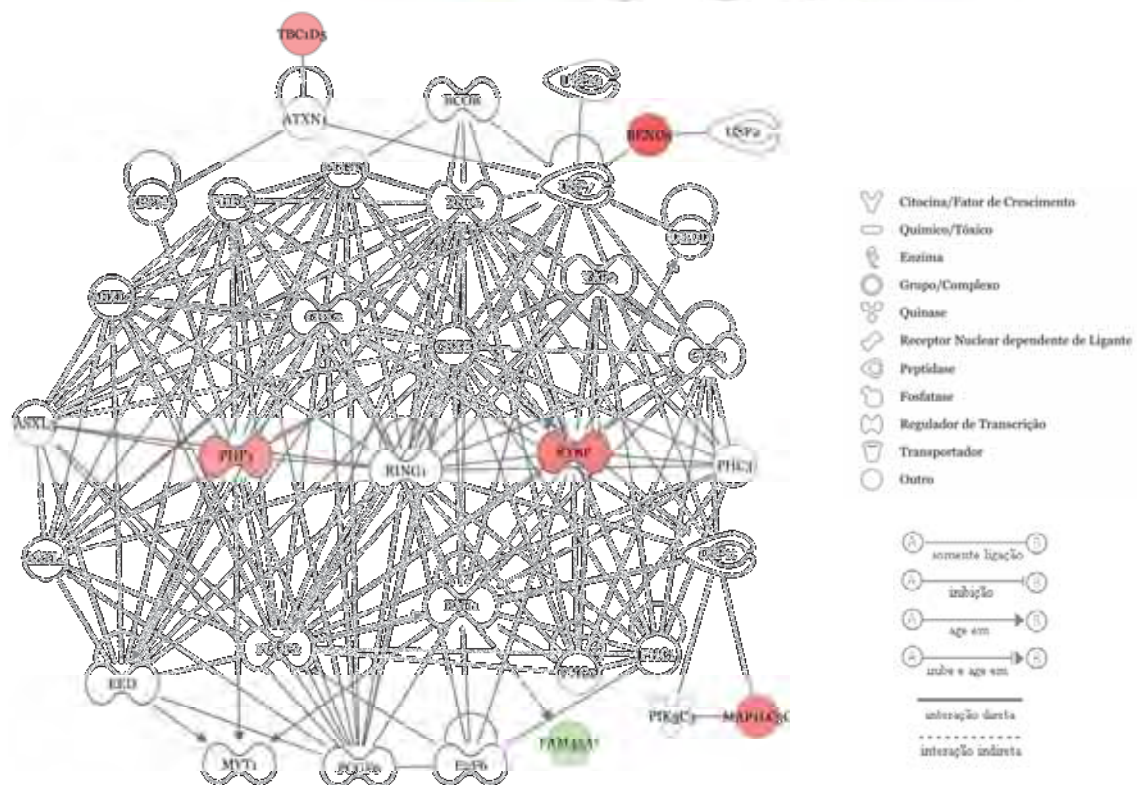


Figura 24. Representação esquemática das quatro principais redes biológicas para casos HPV+ quando comparados a HPV-. (A) Rede com funções principais de morfologia tumoral, desenvolvimento e crescimento celular e proliferação; (B) Regulação da expressão gênica, doenças genéticas e doenças hematológicas; (C) Desenvolvimento e função dos tecidos conjuntivos, desenvolvimento e função dos sistemas esqueléticos e muscular e desenvolvimento de tecidos e (D) Câncer, doenças esqueléticas e musculares e desenvolvimento de tecidos. Em vermelho, genes com aumento de expressão e verde, diminuição. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Entre os genes integrantes das redes e com função conhecida, destacam-se *CRKL*(↓) e *ACOX1*(↓) (rede 1), *TCF12* e *MDH2*(↓) (rede 2), o complexo *TGF beta*, *TNFRSF11B* e *VIM* (rede 3) e *RYBP* e *PHF1* (rede 4). Os genes assinalados com o símbolo (↓) se apresentaram com diminuição de expressão e os demais, com aumento (Figura 24).

Foi realizada também a análise individual dos tumores do grupo positivo (9 casos) e negativo (13 casos). Para essa análise foi utilizado o teste *t* estatístico (programa TMeV *version 4.5*; <http://www.tm4.org>) com FDR 5% e 1000 permutações. Após essa análise, os genes diferencialmente expressos foram comparados com as amostras normais (*pools*) para determinação do *fold change*.

Por meio do programa IPA, foi realizada a comparação entre os dois grupos e determinada as principais redes biológicas e vias canônicas representadas nos tumores com e sem infecção pelo HPV. Foram utilizados genes com *fold change* superior a 2,0 (aumento de expressão) e inferior a -2,0 (diminuição de expressão). Os tumores HPV positivos apresentaram 448 genes diferencialmente expressos, sendo 335 com função conhecida enquanto os negativos, 853 genes no total e 638 com função conhecida (Figura 25).

Dentre as principais doenças e funções moleculares e celulares dessa comparação, destacam-se como mais significativas nos tumores HPV positivos a doença inflamatória e imunológica, doença nos tecidos conjuntivo, esquelético e muscular e doença oftálmica e cardiovascular (Figura 25B). Nos tumores negativos, prevalecem as doenças e funções de ferimento ao organismo e anormalidade e câncer (Figura 25C).

Apenas os tumores HPV+ apresentaram genes diferencialmente expressos associados à doenças hematológicas e resposta antimicrobiana. Da mesma forma, os casos HPV negativos mostraram genes relacionados à duplicação, recombinação e reparo de DNA, metabolismo de droga, metabolismo de aminoácido, entre outras (Figuras 25D e E, respectivamente).

Na tabela 15 estão presentes as duas principais redes biológicas para os grupos HPV positivos e negativos, indicando os genes alterados em cada uma delas.

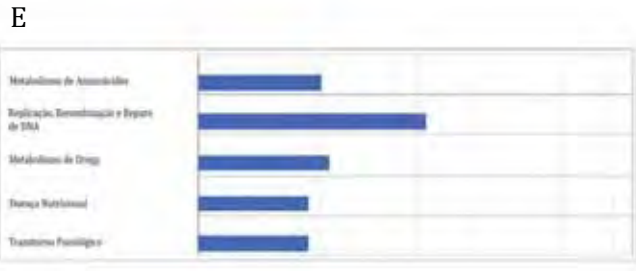
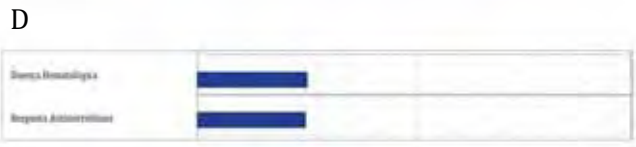
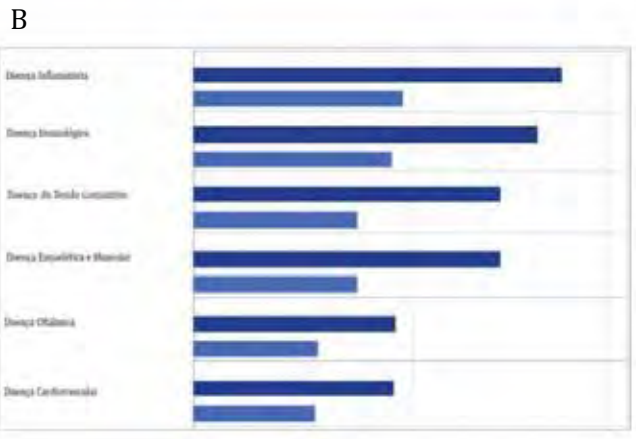
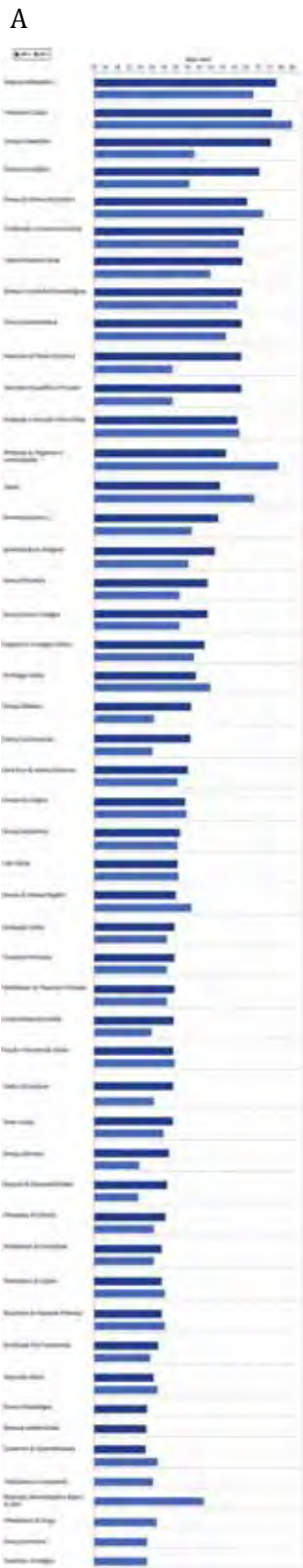


Figura 25. Principais doenças, funções moleculares e celulares (A) na comparação dos casos HPV+ (azul escuro) comparados aos HPV- (azul claro). Em destaque, (B) biofunções mais significativas nos tumores positivos e (C) tumores negativos, além das alterações exclusivas de cada grupo (D e E), respectivamente. Imagens geradas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Tabela 15. Genes diferencialmente expressos relacionados com as principais redes biológicas conhecidas e os scores apresentados para cada uma delas nos casos HPV+ e HPV-.

Grupo	Rede	Funções	Score	Genes alvo	Moléculas participantes das redes (*)
HPV+	1	Doença Inflamatória, Câncer, Doença Hematológica	35	22	<p>↑<i>AEBP1</i>, ↑<i>ASP</i>, ↑<i>CCL2</i>, ↑<i>CCL23</i>, ↑<i>CD34</i>, ↑<i>CLEC10A</i>, ↑<i>CXCL3</i>, ↓<i>DEFB4A/DEFB4B</i>, ↑<i>DOK2</i>, <i>ERK1/2</i>, <i>FCGR1A/2A/3A</i>, ↓<i>FCGR3A</i>, ↑<i>FERMT2</i>, <i>Fibrinogen</i>, <i>Ifn gamma</i>, <i>IL1</i>, <i>IL-1R/TLR</i>, <i>IL17R</i>, ↓<i>IL1F5</i>, ↑<i>IL1R2</i>, ↑<i>MS4A2</i>, <i>NfκB-RelA</i>, <i>NfκB1-RelA</i>, ↓<i>PI3</i>, ↓<i>PIP5K1A</i>, <i>Pkg</i>, ↑<i>PLP1</i>, <i>Pro-inflammatory Cytokine</i>, <i>SAA</i>, ↑<i>TGFB3</i>, <i>Tlr</i>, ↑<i>TLR1</i>, ↑<i>TLR8</i>, ↓<i>TOM1L1</i>, ↑<i>VASP</i></p>
	2	Desenvolvimento e Função do sistema Cardiovascular, Desenvolvimento do Organismo, Morfologia de Tecido	34	22	<p><i>Adaptor protein 1</i>, ↓<i>AKAP7</i>, <i>Ap1</i>, ↑<i>AP1S2</i>, <i>Ap2 alpha</i>, <i>Cbp</i>, ↑<i>CITED1</i>, <i>Elastase</i>, ↑<i>EMCN</i>, <i>ETS</i>, ↑<i>ETS2</i>, <i>ETV5</i>, ↑<i>F5</i>, ↑<i>FBLN1</i>, <i>FSH</i>, ↑<i>GAS1</i>, ↑<i>GATA6</i>, <i>hCG</i>, ↓<i>IGK@</i>, ↑<i>IL2RA</i>, <i>Immunoglobulin</i>, ↑<i>JAK3</i>, <i>Mapk</i>, <i>Mek</i>, ↑<i>MSR1</i>, ↑<i>MUC2</i>, <i>Mucin</i>, ↑<i>NPHS2</i>, ↑<i>PRDM1</i>, ↑<i>PTGDS</i>, ↑<i>PTGS2</i>, ↑<i>RGS2</i>, ↓<i>SERPINE1</i>, <i>TMSB4</i>, ↑<i>ZBED1</i></p>
HPV-	1	Metabolismo de Droga, Metabolismo de Lipídeos, Bioquímica de Moléculas Pequenas	43	28	<p><i>ALDH1A1</i>, <i>ALDH1L1</i>, ↓<i>ALDH5A1</i>, <i>ALDH8A1</i>, ↓<i>BRIP1</i>, ↑<i>CATSPER1</i>, <i>CHIC2</i>, ↓<i>DCAF13</i>, ↑<i>DLST</i>, ↑<i>DUSP19</i>, ↓<i>FBXW2</i>, ↑<i>FOXA2</i>, ↑<i>GRIK3</i>, <i>GRIN2D</i>, ↑<i>HIST1H2AD</i>, ↑<i>HNF4A</i>, ↓<i>HOXA5</i>, ↓<i>MED17</i>, ↓<i>MTMR2</i>, ↑<i>NFE2L1</i>, ↑<i>NLN</i>, ↑<i>NUDT11</i>, ↑<i>ONECUT2</i>, ↑<i>PFKFB4</i>, ↓<i>PHTF1</i>, ↑<i>PPP1R12B</i>, ↓<i>QRSL1</i>, <i>RPS25</i>, ↑<i>SEPX1</i>, ↓<i>SLC43A1</i>, ↓<i>SPATA6</i>, ↓<i>TDRKH</i>, <i>UMPS</i>, <i>ZNF577</i>, ↓<i>ZNF586</i></p>
	2	Doença do sistema Reprodutivo, Função e manutenção Celular, Morfologia do Tecido	36	25	<p>↓<i>AKAP7</i>, ↓<i>CARD9</i>, ↓<i>CFTR</i>, <i>CHEMOKINE RECEPTOR</i>, ↑<i>CITED1</i>, ↑<i>CXCR5</i>, ↑<i>DLX2</i>, ↓<i>DLX5</i>, ↓<i>ETV5</i>, <i>FSH</i>, <i>G protein alpha</i>, <i>G protein beta gamma</i>, ↑<i>GATA6</i>, <i>hCG</i>, ↓<i>IGK@</i>, ↑<i>INHBB</i>, <i>Lh</i>, <i>Mapk</i>, ↑<i>MT1X</i>, <i>NADPH oxidase</i>, ↑<i>NOL3</i>, ↓<i>PDE4D</i>, <i>Pkg</i>, <i>Plc beta</i>, ↑<i>PLCB2</i>, ↓<i>PMCH</i>, ↓<i>PRKACB</i>, ↑<i>PRKAR2A</i>, ↑<i>PTPRF</i>, ↑<i>RGS4</i>, ↓<i>RGS5</i>, ↓<i>RGS13</i>, ↑<i>SLC6A4</i>, ↑<i>SPDEF</i>, ↓<i>USPL1</i></p>

(*): aumento de expressão gênica ↑; diminuição de expressão gênica ↓.

6. Análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos

Os resultados da análise descrita abaixo foram obtidos com a colaboração do Fábio Albuquerque Marchi, Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Bioestatística, Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, IME, Universidade de São Paulo, SP. Os resultados da análise integrada foram obtidos a partir da comparação entre os dados genômicos e transcriptômicos em 22 casos de carcinoma de orofaringe. Pelo fato da abordagem utilizada para a integração dos dados necessitar da geração de dados organizados por análise de segmentação e G-scores, os 22 casos foram re-avaliados quanto a alterações no número de cópias genômicas. As etapas da obtenção dos resultados de CGH-array e *microarray* de expressão estão representadas na Figura 26.

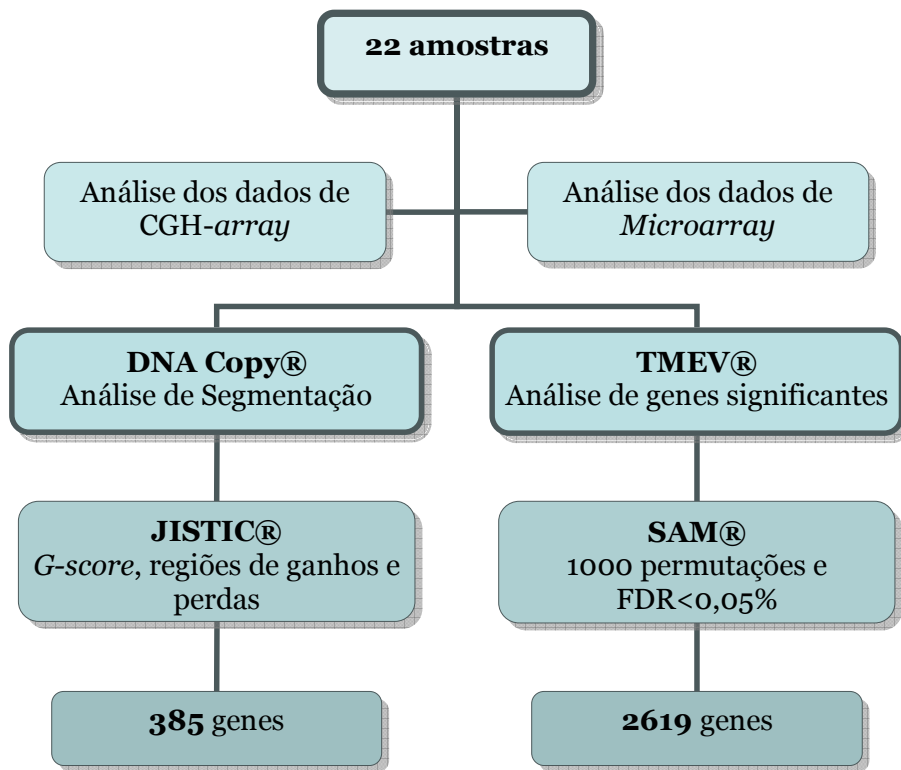


Figura 26. Etapas da análise dos dados de CGH-array (genômicos) e de expressão gênica em larga escala (transcriptômicos) para obtenção dos genes significantes.

6.1. CGH-array

A análise dos dados genômicos foi dividida em duas etapas: a segmentação e a obtenção das regiões com alterações significativas. A primeira envolveu a identificação de alterações no número de cópias ou de pontos de quebra. Para isso foi utilizado o método não-paramétrico *DNA Copy* (Olshen *et al.*, 2004). Os perfis genômicos de cada caso foram gerados, segundo demonstrado na figura 27. A segunda etapa foi a utilização do algoritmo JISTIC (Beroukhim *et al.*, 2007) para as 22 amostras segmentadas, com *cut-off* entre 0,2 e 0,6 para ganhos e ampliações e -0,2 e -1,0 para deleções de 1 e 2 cópias, respectivamente. Nesta análise, foi utilizado um limiar de sensibilidade de 0,03 (*q*-valor). Os genes mapeados em regiões significativamente alteradas foram escolhidos como candidatos a moduladores. Com esse algoritmo, foi possível identificar 385 genes mapeados em regiões com *G-score* significativo (picos de alterações) para ganhos (314) e perdas genômicas (61).

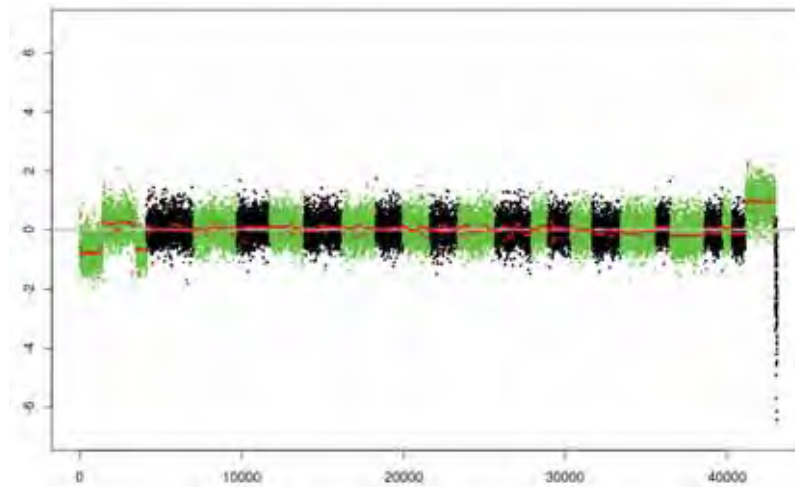


Figura 27. Análise de segmentação realizada pelo *DNA Copy*. No eixo x, os valores de 0 a 40.000 representam o número de marcadores do algoritmo para todos os cromossomos. As cores alternativas representam os cromossomos (1 a 22, X e Y), no qual o primeiro grupo de pontos verdes indica o cromossomo 1. No eixo y, os valores de \log_2 mostram as variações abaixo de zero (linha vermelha no eixo central), indicando regiões envolvidas em perdas e as variações acima de zero, indicam as regiões envolvidas em ganhos genômicos. Regiões sem oscilação do eixo central não apresentam alterações no número de cópias de DNA (*DNA Copy*).

6.2. Perfil de expressão gênica

Nesta análise, foram utilizados os 2619 genes significantes, com seus respectivos valores de alteração (\log_2ratio) (SAM, 1000 permutações aleatórias e taxa de falsos positivos representado por um FDR=0%). Transcritos com valores de $\log_2ratio \leq -1.0$ e ≥ 1.0 (*fold-change*) foram classificados com diminuição ou aumento de expressão, respectivamente.

6.3. Integração dos dados – CONEXIC

Após a obtenção das regiões genômicas e genes significantes, o algoritmo CONEXIC (Akavia *et al.*, 2010) foi utilizado na integração dos dados. Este algoritmo é baseado na premissa de que genes moduladores (ou *drivers*) são diferencialmente expressos devido a diferentes mecanismos biológicos, como ganhos e perdas genômicas, fornecendo uma vantagem adaptativa para o desenvolvimento do tumor. Para a obtenção destes genes, foram realizadas três etapas fundamentais: 1) seleção dos genes candidatos a moduladores (JISTIC); 2) associação entre os genes candidatos a moduladores e os módulos gênicos (análise de expressão gênica) e 3) utilização de redes de aprendizagem que aumentam o poder de seleção dos genes candidatos. Após estas etapas, foram identificados 7 genes moduladores. A tabela 16 mostra a distribuição dos 22 genes identificados segundo o padrão de ganhos e perdas genômicas e expressão aumentada ou diminuída entre as amostras, assim como as regiões genômicas, valores do JISTIC e CONEXIC e informações adicionais de cada gene.

Tabela 16. Genes moduladores resultantes da análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos.

q-valor JISTIC	Pontuação CONEXIC	CGH-array*	Microarray*	Região	Início	Final	Símbolo do gene	Nome do gene
<0,03	1231.24	+	-	1p36.33	850983	869824	<i>SAMD11</i>	<i>Sterile alpha motif domain containing 11</i>
<0,03	13323.23	+	-	11q13.2	67576901	67645434	<i>CHKA</i> (*)	<i>Choline kinase alpha</i>
<0,03	4421.27	+	-	22q11.21	19458382	19472008	<i>SERPIND1</i> (*)	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), membro 1</i>
<0,03	2982.22	+	-	22q11.21	19692495	19698576	<i>MGC16703</i>	<i>Tubulin, alpha pseudogene</i>
<0,03	3361.0	+	-	Xq28	151617900	151621470	<i>MAGEA6</i> (*)	<i>Melanoma antigen family A, 6</i>
<0,03	873.32	+	-	Xq28	151636039	151637735	<i>MAGEA2B</i>	<i>Melanoma antigen family A, 2B</i>
<0,03	123.24	+	+	1p36.33	891739	900345	<i>PLEKHN1</i>	<i>Pleckstrin homology domain containing, family N member 1</i>
<0,03	343.55	+	+	1p36.3	1128750	1131952	<i>TNFRSF18</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18</i>
<0,03	4632.21	+	+	1p36	1136568	1139375	<i>TNFRSF4</i> (*)	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4</i>
<0,03	NA	+	+	1p36.33	1540657	1555853	<i>MIB2</i>	<i>Mindbomb homolog 2 (Drosophila) [Homo sapiens]</i>
<0,03	980.09	+	+	1p36.3	1557422	1559893	<i>MMP23B</i>	<i>Matrix metalloproteinase 23B</i>
<0,03	8009.12	+	+	1p36.33-p36.2	1971768	2106694	<i>PRKCZ</i> (*)	<i>Protein kinase C, zeta</i>
<0,03	1923.23	+	+	8p11.2	38251717	38358947	<i>WHSC1L1</i>	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1</i>
<0,03	199.26	+	+	11q13.2	66827494	66836652	<i>SSH3</i>	<i>Slingshot homolog 3 (Drosophila) [Homo sapiens]</i>
<0,03	5633.98	+	+	11q13	67107641	67110700	<i>GSTP1</i> (*)	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>
<0,03	485.85	+	+	11q13.3	68528437	68537426	<i>MRGPRF</i>	<i>MAS-related GPR, member F</i>
<0,03	787.4	+	+	14q32.33	104402698	104434132	<i>KIAA0284</i>	<i>Kiaa0284</i>
<0,03	423.89	+	+	14q32.33	104474635	104515739	<i>AHNAK2</i>	<i>AHNAK nucleoprotein 2</i>
<0,03	992.5	+	+	17q25.3	78630855	78646011	<i>METRNL</i>	<i>Meteorin, glial cell differentiation regulator-like</i>
<0,03	NA	+	+	22q11.21	17403794	17489967	<i>DGCR2</i>	<i>Digeorge syndrome critical region gene 2</i>
<0,03	2529.09	+	+	22q11.21	18124225	18151112	<i>TBX1</i>	<i>T-box 1</i>
<0,03	3411.88	+	+	Xp22.32	1347692	1388828	<i>CSF2RA</i> (*)	<i>Colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)</i>

Os sinais positivos (+) e negativos (-) representam o status dos genes em relação ao padrão de ganhos (+) e perdas (-) e ao aumento (+) e diminuição (-) de expressão gênica. JISTIC = análise de segmentação dos dados de CGH-array; CONEXIC = classificação do algoritmo para os genes moduladores; (): Genes moduladores.

6.4. Predição de regulação gênica por miRNA.

Entre os 22 genes moduladores identificados, 16 apresentaram correlação positiva (ganho genômico/aumento expressão) e o restante deles (6) apresentaram correlação inversa (ganho genômico e expressão diminuída). Sendo assim, foi realizada uma análise de predição de regulação gênica por miRNA com o objetivo de verificar se o comportamento de correlação inversa poderia ser explicado por este mecanismo. Foi realizada uma busca nos bancos de dados *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>), *PicTar* (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertibrate.cgi) e *mirDIP* (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/search.jsp>) que são ferramentas de predição de regulação gênica por miRNAs, para os genes que apresentaram correlação inversa (Tabela 17). Somente os genes *SAMD11* e *CHKA* apresentaram predição para serem regulados por miRNA, ambos com ganho genômico e diminuição de expressão gênica, mapeados em 1p36.33 e 11q13.2, respectivamente.

Tabela 17. Genes identificados na análise integrada baseada nos achados de correlação inversa (ganho genômico/diminuição de expressão) e seus miRNAs preditos.

Gene	<i>TargetScan</i>	<i>PicTar</i>	<i>mirDIP</i> (score _(std) > 50)
<i>SAMD11</i>	hsa-miR-504	-	-
<i>CHKA</i>	hsa-miR-30e, hsa-miR-30a, hsa-miR-30d, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c	-	hsa-mir-136, hsa-mir-30a, hsa-mir-30b, hsa-mir-30c, hsa-mir-30d, hsa-mir-30e, hsa-mir-367, hsa-mir-487a, hsa-mir-32, hsa-mir-92b, hsa-mir-200a, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-199b-3p, hsa-mir-25, hsa-mir-363, hsa-mir-92a, hsa-mir-143, hsa-mir-30e, hsa-mir-485-3p
<i>SERPIND1</i>	-	-	-
<i>MGC16703</i>	-	-	-
<i>MAGEA6</i>	-	-	-
<i>MAGEA2B</i>	-	-	-

TargetScan (<http://www.targetscan.org/>); **PicTar** (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertibrate.cgi); **mirDIP** (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/search.jsp>) e (-) sem predição de miRNA.

6.5. miRNAs mapeados em regiões de ganhos e perdas genômicas

Os genes codificadores de miRNAs mapeados em regiões de ganhos e perdas genômicas deste estudo foram anotados assim como os genes por eles regulados por meio dos programas *Nexus* e *IPA*, respectivamente. Os achados genômicos de alterações nos miRNAs foram comparados com o padrão de expressão dos genes que eles regulam. No total foram identificados 60 miRNAs em regiões genômicas alteradas elegíveis para regulação gênica, porém somente 11 deles regulam genes com alto poder preditivo. Estes miRNAs foram importados ao sistema IPA (que utiliza os bancos de dados de predição *TargetScan* e *PicTar*), onde foi gerada uma lista de 8014 genes alvos altamente preditos. Estes genes foram comparados aos 2619 genes identificados na análise de expressão gênica global, resultando em 607 genes sobrepostos.

Os resultados foram organizados de acordo com o mapeamento dos miRNAs na regiões de alterações cromossômicas, os genes regulados por estes miRNAs que estavam mapeados em regiões de ganhos ou perdas genômicas e aumento ou diminuição de expressão (\log_2ratio , *cut-off* de 1.5) (Tabela 18).

Entre os dados gerados, foram analisados os miRNAs mapeados em regiões de ganhos cromossômicos assim como os genes por eles regulados. Na tabela 18, os miRNAs envolvidos em ganhos foram dispostos a frente dos genes preditos com diminuição de expressão e os miRNAs envolvidos em perdas, a frente dos genes com aumento de expressão. Esta ordem de apresentação representa um dos mecanismos de regulação de miRNA (correlação inversa), porém já foram relatados outros com correlação positiva e/ou negativa dos miRNAs e genes preditos.

Tabela 18. miRNAs mapeados em regiões de ganhos e perdas genômicas e a correlação entre a alteração no número de cópias e o padrão de expressão de seus genes preditos.

miRNA	Evento	Região	Genes regulados por miRNAs	aCGH	Expressão
mir-548	Ganho	11q13.1- q13.3	<i>IL6, VAMP4, PGBD1, IGF2BP3, DPY19L1, TMEFF1, AUTS2, HCP5, DPY19L1, PEX19, IGFBP3, TRPC1, ALDH2, ALDH5A1, LBH, HCP5, TRIM58, SPRED2, NUP160, ICOS, OXCT1, PARP14, TAC1, AMN1, FMOD, MSH2, HOXC8, FAM120A, PRKCE, ZNF267, PPP1CC, CYCS, IL10, KIAA1804, RAB10</i>	Ganho	-
			<i>C12orf29, PDPN, DAG1, PRKG1, LYZL2, PRTG, GABRA2, DNAJC18, C10orf107, PTPN22, CDO1, OPTN, ANKRD1, TCF7, BNIP3, RHOJ, TMEM26, ROBO4, THBS1, LOXL2, NLN, ELOVL4, PDGFC, C13orf31, CLEC5A, CXCL2, PAPLN, ADAM28, COL10A1, DLC1, SPOCK1</i>	Perda	+
			<i>SPP1, CLCA4, TRIM52, KCNH8, PPARG, ZCCHC11, CXCL10, AKAP7, DACH1, FAM81A, NTNG1, NUDT13, DLAT, RIC3, CENPK, PIH1D2, SPINK7, PDZD8, FREM1, FBN2, TMEM135, ZNF239, UBE4A, BCKDHB, DCLRE1A, RNF111, C3orf63, C6orf170, FBXO22, FANCM, RMI1, SLC25A38, LCMT2, COMMD10, SEPSECS, LYRM7, KTI12, TRIM52, PRPF38B, NUP98, AQP3, HEMK1, FAM53B, CADPS, KIF24, ANKRA2, AP3M1</i>	Perda	-
			<i>RAB26, LACTB2, TPM3, CAP2, NRBP2, HGSNAT, CRABP2, NOTCH1, DDR1, CORO2A, AUTS2, CLDN1, NTF3, CLDN11, CDH5, PALM2-AKAP2, FKBP7, PAQR9, PLEKHA5, NDRG1, SH2B3, PTGS2, ETV6, CCDC80, PTPRF, SPON1, DLX2, TFPI2, EMP1</i>	Ganho	+
mir-612	Ganho	11q13.1- q13.3	<i>HOXA13, FCRL1</i>	Ganho	-
			<i>B4GALNT1</i>	Ganho	+
mir-8	Ganho	1p36.33- p36.32	<i>HOXA5, CCNE2, HOXA11, TMEFF2, ITSN2</i>	Ganho	-
			<i>ELAVL4, FARP1, FN1, PRDM1, FN1, TTLL7, FN1</i>	Perda	+
			<i>ATXN7, ZNF644, ITSN2, KIAA1432, AQP11</i>	Perda	-
			<i>ITSN2, GPR109A, LRP1, PLEKHA6, LRRC8A</i>	Ganho	+
MIR1323	Perda	19q13.41	<i>KRCC1</i>	Ganho	-
			<i>CEP55</i>	Perda	+
			<i>GATM, ZNF259</i>	Perda	-
			<i>DERL1</i>	Ganho	+

mir-290	Perda	19q13.41	RAPGEF5, PRDM16, PHF14, PFN2, E2F5, PHC3, PIK3C2A, PIK3R3, DCBLD2, USP42, MYBL1, EGFR, CYLD, POLQ, ITGB8, C5orf28, ARL13B, MARK1, RAB3IP, SLC38A1, DMTF1, CDCA7, PLCL1, JHDM1D, ECT2, GLS	Ganho	-
			C6orf168, QRSL1, PRKACB, PDE4D, SLC46A3, FAM76B, GNPDA2, ARHGAP24, PDCD4, PAPSS2, PRMT6, PDE4D, NFX1, FRMD4A, PDGFD,	Perda	-
			E2F2, MCC, ZBTB47, CD44, CXCL12, KIAA1522, C15orf2, FGD5, WFS1, FAM40B, TTC9	Perda	+
mir-498	Perda	19q13.41	FMO2, SPN, CES2, MFN2, CRIM1, INHBB, NAV1, FOXD2, VEGFA, PRRX1	Ganho	+
			LIFR, DBF4	Ganho	-
			GCNT1	Perda	+
mir-515	Perda	19q13.41	TMPRSS11A, CXCR6, KLF12, CEP57, GLMN, TRDMT1	Perda	-
			OLR1	Ganho	+
			PFN4, TDRKH, E2F6, RGS5, PRKD3, FBXW2, ETV5, MLLT11, C7orf46, PHTF2, PTPRO, ITIH5, TMEM45A, TAF5L, RIT1, CHN2, PRKD3, SEMA3E, ROCK2, GTF2IRD2, ANP32E, ELOVL5, E2F6, TMEM132B, PIP5K1A, XRN1, HCG27, GRB14, GCET2, GCC2, HSPC159, C16orf73, NUDCD1, ZNF138, TOR1AIP1, PLEKHF2, NCOA1, ADAMTSL2, ZNF273, PELI1, TFRC, CDCA7L	Ganho	-
RAB18, PCMI, LRP8, CRMP1, DDOST, ADRA1B, SLAIN1, WNT4, MIER1, CNR1, CGGBP1, EIF4E3, SH3PXD2A, SEPT2, COL4A1, FBLN2, UGDH, CYR61, NTRK2, SLC7A11, PTPRZ1, BBOX1, JUN, USP31, NPNT, SLC11A1, JMJD1C, COL4A1, ROR1, DBN1, TBX18, PCDHA1, LMNB1, HRH1, ATP8B4, MSRI, LZTS1, CXCL5, BDNF, SFRP2, MSRI, ROR1, FGF7	Perda	+			
mir-515	Perda	19q13.41	AADAT, ABCD3, WWC2, GRIA2, TP53TG3, NPAT, BDNF, KBTBD11, ATP5L, CLCA2, SOLH, TMEM41B, MTMR2, CLEC14A, PASK, ITBK2, CLASP2, CA12, FOXA1, MGA, LRCH1, FANCD2, WASF3, ZNF248, KIAA1826, MCCC2, SMOC1, SETD5, NBEA, ALG9, ATP11A, ZNF197, HSD17B11, HSD17B11, AASDHPPT, CCPG1, MTO1, TMEM41B, SPG20, CASP2, ACTR8, SACS, TRUB1, WHSC1, MKLN1, CYP2U1, FOXA1, SEC23IP, RBM26, KCTD14, ABCE1, AKAP11, CASC4, DOCK2, HS6ST3, ENOX1	Perda	-
			RIMBP2, HLA-DPB1, PLXNA2, PLSCR4, NOTCH4, PRR15, CDC42BPB, HIVEP3, ZDHHC1, HIVEP3, COG8, BICD2, AHRR, ANXA4, FOSL2, CDKN1A, NMNAT2, AKT3, PKHD1, PTPN3, MUC17, PTGS1, HLA-DPB1, IFT81, C8orf34, SOX8, RGS2, CDH1, HIST1H2AD, SOX11, SKI, PPP1R12B, KIAA1467, RGS4, TM2D2, CDC42BPA, PFKFB3, MEOX2, SFRP4, TSPAN9, FMN2, RAGE, SLCO2A1, CMTM4, THBS2, HORMAD1	Ganho	+

*Sinais positivos indicam expressão gênica aumentada e sinais negativos, indicam expressão diminuída (\log_2 ratio, cut-off de 1.5).

6.6. Meta-análise com dados públicos disponíveis no GEO

Os 22 genes encontrados com alteração genômica e transcriptômica (Tabela 16) foram comparados ao banco de dados GEO (*Gene Expression Omnibus* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) onde estão depositados os resultados de estudos de expressão gênica em larga escala. Foi possível obter dados depositados no GEO de apenas dois relatos em literatura porém, o estudo de Slebos *et al.* (2006) é o único que utiliza amostras de orofaringe em sua casuística. Esta análise permitiu identificar genes que já foram associados com CCP e também a descrição de novos transcritos. Estes estudos estão armazenados sob os códigos GSE3292 (Slebos *et al.*, 2006) e GSE6791 (Pyeon *et al.*, 2007) (Tabela 19).

A maioria dos genes foram identificados nos estudos descritos previamente em literatura. Estes genes apresentaram diferentes padrões de expressão gênica, no qual 75% deles apresentaram o mesmo padrão de expressão dos estudos depositados no GEO.

Tabela 19. Meta-análise dos genes detectados em estudos prévios de expressão gênica global em carcinomas de cabeça e pescoço depositados no banco de dados *GEO* - *Genomic Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Gene	Estudo atual	Slebos <i>et al.</i>, 2006	Pyeon <i>et al.</i>, 2007
<i>SAMD11</i>	-2,16	3,00	2,95
<i>CHKA</i>	-1,57	3,02	2,78
<i>SERPIND1</i>	-0,34	2,89	2,54
<i>MGC16703</i>	-1,06	2,93	2,86
<i>MAGEA6</i>	-3,33	3,09	2,31
<i>MAGEA2B</i>	-4,11	ND	ND
<i>PLEKHN1</i>	1,71	3,14	2,89
<i>TNFRSF18</i>	2,78	3,13	2,78
<i>TNFRSF4</i>	2,37	2,97	2,80
<i>MIB2</i>	1,79	3,04	2,97
<i>MMP23B</i>	1,95	ND	ND
<i>PRKCZ</i>	0,86	2,98	2,37
<i>WHSC1L1</i>	0,65	3,12	2,87
<i>SSH3</i>	0,46	3,15	3,25
<i>GSTP1</i>	1,46	3,35	3,57
<i>MRGPRF</i>	0,57	3,02	2,77
<i>KIAA0284</i>	1,32	3,06	3,35
<i>AHNAK2</i>	2,81	3,06	3,02
<i>METRNL</i>	1,68	3,03	3,19
<i>DGCR2</i>	1,03	3,06	2,95
<i>TBX1</i>	2,00	3,10	2,55
<i>CSF2RA</i>	2,64	2,88	2,33

Valores apresentados como a alteração de expressão em \log_2ratio . Valores negativos (-) indicam diminuição de expressão e valores positivos (+ ou maior que zero) indicam expressão aumentada. Em negrito, genes que apresentaram o mesmo padrão de expressão gênica dos estudos depositados no GEO. ND=não identificado no estudo.

6.7. Análise funcional dos genes alterados

Os genes com alterações tanto por CGH-*array* quanto por expressão gênica global foram submetidos a análises funcionais pelo programa IPA. Os resultados obtidos mostraram 21 genes elegíveis com funções conhecidas, representados em duas redes gênicas principais, com valores de *scores* de 11 e 23. Valores de *scores* mais altos indicam maior associação entre os genes importados com as moléculas do banco de dados IPA. Essas redes estão apresentadas na tabela 20 e representadas na figura 28. As duas principais redes gênicas estão relacionadas a atividades como câncer, doenças dermatológicas e função e manutenção celular (rede 1) e sinalização e interação célula-célula, morte celular e resposta inflamatória (rede 2) (figuras 28A e B, respectivamente).

As principais doenças e funções moleculares e celulares relacionadas aos genes com alteração nos níveis genômicos e transcriptômicos estão representadas na figura 29A. As vias canônicas descritas, plotadas em valores da razão sobre $-\log(P \text{ valor})$, foram principalmente associadas com resposta ao estresse oxidativo mediado por *NRF2*, sinalização de extravasamento leucocitário, produção de IL-15, entre outras. Como o número de genes com alteração tanto no número de cópias, quanto na expressão do mRNA foi pequeno (22 genes), nenhuma das vias apresentadas relataram mais de dois genes alterados (Figura 29B).

Tabela 20. Redes gênicas com os scores gerados a partir da associação dos 22 genes com o banco de dados do *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

Rede	Funções Principais	Score	Genes alvo	Moléculas participantes das redes(*)
1	Câncer, Doenças Dermatológicas e Função e Manutenção Celular	23	10	“atypical protein kinase C”, <i>Bvr</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>DAPK3</i> , <i>DMBT1</i> , <i>F2</i> , <i>F11R</i> , <i>Gata</i> , <i>GLRX3</i> , <i>GRIN1</i> , ↑ <i>GSTP1</i> , <i>JUN</i> , ↑ <i>KIAA0284</i> , <i>LARP6</i> , ↓ <i>MAGEA2/MAGEA2B</i> , ↑ <i>MIB2</i> , <i>MLL3</i> , <i>NFkB</i> (complex), <i>NQO1</i> , <i>NUMB</i> , <i>PDCD2</i> , <i>PDRG1</i> , <i>PEG3</i> , <i>PRKCH</i> , ↑ <i>PRKCZ</i> , ↓ <i>SERPIND1</i> , ↑ <i>SSH3</i> , <i>STX4</i> , ↑ <i>TBX1</i> , ↑ <i>TNFRSF4</i> , ↑ <i>TNFRSF18</i> , <i>TNFSF4</i> , <i>TNFSF18</i> , <i>TP53</i> , <i>YWHAB</i>
2	Sinalização e Interação Célula-Célula, Morte Celular e Resposta Inflamatória	11	5	<i>BGN</i> , <i>CASP6</i> , ↓ <i>CHKA</i> , <i>choline</i> , ↑ <i>CSF2RA</i> , <i>CSF2RB</i> , <i>EIF4G1</i> , <i>Gm-csf</i> , <i>HMOX1</i> , <i>HSPB1</i> , <i>IDO1</i> , <i>IL2</i> , <i>IL3</i> , <i>IL27</i> , <i>IRAK1</i> , <i>IRS2</i> , <i>KIAA1967</i> , <i>lipoxin A4</i> , ↓ <i>MAGEA3/MAGEA6</i> , ↑ <i>MMP23B</i> , <i>NCF1C</i> , <i>NFATC2</i> , <i>NQO1</i> , <i>p70 S6k</i> , <i>PEA15</i> , <i>PI3K</i> (complexo), <i>PIK3CG</i> , <i>PKN2</i> , ↑ <i>PRKCZ</i> , <i>PSMB8</i> , <i>REL</i> , <i>RPSA</i> , <i>SDC2</i> , <i>SLC2A4</i> , <i>TNF</i>

(*): aumento de expressão gênica ↑; diminuição de expressão gênica ↓.

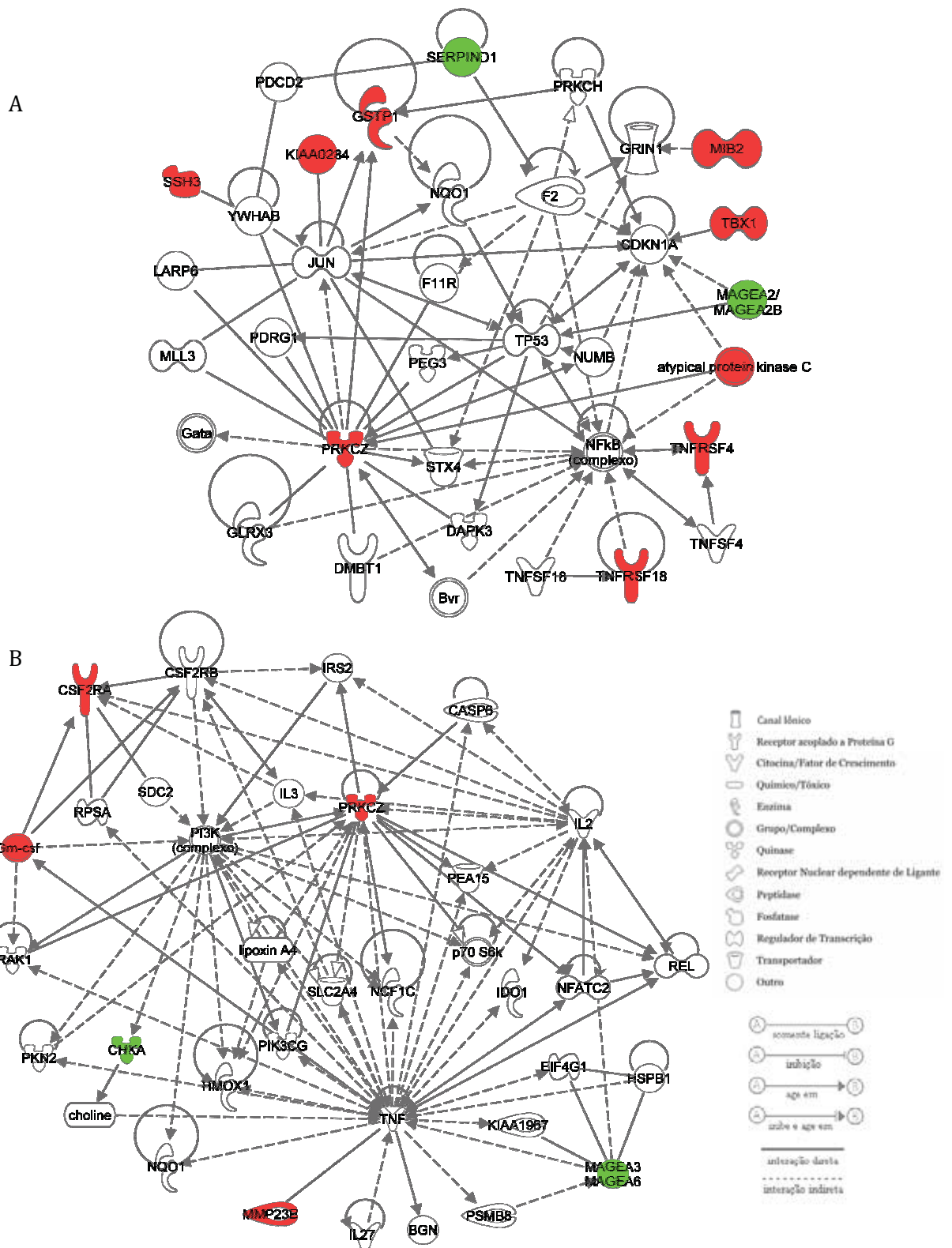


Figura 28. Representação esquemática das principais redes biológicas que envolvem genes com alteração genômica e transcricômica. Funções principais (A) câncer, doenças dermatológicas e função e manutenção celular e (B) sinalização e interação célula-célula, morte celular e resposta inflamatória. Em vermelho, genes com aumento de expressão e verde, diminuição. Imagens geradas pelo *software Ingenuity Pathways Analysis (IPA)*.



Figura 29. Principais doenças, funções moleculares e celulares (A) e vias canônicas (B) com participação dos genes diferencialmente expressos (em porcentagem) nos carcinomas de orofaringe. Os scores, $-\log(\text{valor de } P)$, são calculados pelo teste exato de *Fischer*. Imagens geradas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Discussão

DISCUSSÃO

Os principais fatores de risco associados aos carcinomas de orofaringe são o consumo excessivo de tabaco e álcool. Entretanto, dados epidemiológicos recentes indicam que o envolvimento dos HPVs de “alto risco” como fatores etiológicos em um subgrupo de carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo orofaringe (Gillison *et al.*, 2000; Fakhry e Gillison, 2006; Jung *et al.*, 2010).

A incidência de HPV nos carcinomas de orofaringe é a maior entre os tumores de cavidade oral; o subtipo HPV16 é encontrado em 87-90% dos carcinomas de orofaringe HPV positivos, enquanto o HPV18 é observado em 3% destes tumores (Gillison *et al.*, 2000; Kreimer *et al.*, 2005). No presente estudo, 37 casos de carcinoma de orofaringe foram genotipados para a presença de 37 subtipos de HPV. Foi detectada a presença do vírus em mais de 35% dos casos analisados (13 de 37 casos). O HPV subtipo 16 foi detectado em 8/13 casos positivos (62%) e o subtipo 18 em 2/13 casos positivos (15%). Um caso (8%) era HPV16/HPV18 e dois casos (15%) apresentaram o subtipo de baixo grau HPV26. Em um estudo caso-controle sobre a infecção de HPV em CECP, o HPV16 estava presente em 72% dos carcinomas de orofaringe (D'Souza *et al.*, 2007).

Os tumores associados a HPVs de “alto risco” parecem estar relacionados com comportamento sexual, tais como sexo oral e aumento do número de parceiros sexuais, às vezes não possuindo associação com tabaco e álcool (D'Souza *et al.*, 2007; Gillison *et al.*, 2008; Dayyani *et al.*, 2010). Não foi possível o acesso aos dados de comportamento sexual dos pacientes porém, entre os casos HPV positivos (13 casos), quatro deles (31%) alegam não ser tabagistas e seis (46%) não etilistas, porém 6/13 casos (46%) relatam consumo prévio de tabaco ou álcool em algum período.

Indivíduos com tumores de cabeça e pescoço HPV positivos tendem a ser mais jovens e fazer menor uso de tabaco e álcool quando comparados com indivíduos com tumores HPV negativos (Lindel *et al.*, 2001; Dahlgren *et al.*, 2004; Gillison *et al.*, 2009; Jabbar *et al.*, 2010). A maioria dos casos com infecção pelo vírus (9/13 casos) ocorreu em idade inferior a 60 anos (69%) e 11 dos 15 pacientes com idade superior à 60 anos eram HPV negativos, concordante com os achados de Machado *et al.* (2010). Os autores encontraram associação estatisticamente significativa entre a presença de

CCP HPV positivos e idade intermediária (entre 40 e 60 anos) de aparecimento da doença ($P=0,02$). De alguma maneira ainda não bem estabelecida, a infecção pelo HPV antecipa a carcinogênese, resultando em um fenótipo tumoral precoce comparado aos pacientes sem associação com o vírus.

Entre os 37 casos aqui avaliados, sete (19%) alegam não ser tabagistas e dez (27%) não etilistas. Porém, doze casos (32%) relatam consumo prévio de pelo menos um deles (tabaco ou álcool).

Clinicamente, os CCP associados a HPV's tendem a apresentar comprometimento de linfonodos, com principal incidência loco-regional na orofaringe, principalmente tonsilas palatinas, sendo histologicamente de alto grau, podendo apresentar morfologia basalóide (Gillison *et al.*, 2000; Andl *et al.*, 1998; Fakhry *et al.*, 2008; Dayyani *et al.*, 2010). Concordante com dados em literatura, a maioria dos casos HPV positivos deste estudo possuem localização tonsilar (amígdalas) (8/13 casos - 61%). A explicação biológica da prevalência do HPV ser maior nessa região permanece desconhecida. A similaridade e a complexidade entre o epitélio das amígdalas e o epitélio da cérvice uterina, no qual a infecção por HPV está presente na maioria dos tumores do trato genital feminino, pode ser uma das explicações biológicas para a maior prevalência de HPV nos tumores de orofaringe comparados com os demais CCP (Winer *et al.*, 2003; Kreimer *et al.*, 2005).

1. Alterações no número de cópias genômicas

Há um número limitado de estudos em literatura que utilizaram a técnica de CGH-*array* em carcinomas de cabeça e pescoço, especialmente em orofaringe. Entre os 32 carcinomas de orofaringe aqui avaliados, foram identificadas 3222 alterações genômicas com prevalência de perdas heterozigotas (46,6%), seguida de ganhos (40,7%), alto nível de ganhos (7,9%) e perdas homozigotas (4,8%). Ganhos ou ampliações genômicas são considerados os principais mecanismos pelos quais os proto-oncogenes podem ser ativados e as perdas genômicas podem ser responsáveis pela inativação de genes supressores tumorais. Estas alterações podem também envolver sequências reguladoras resultando na modificação da expressão de vários fatores associados ao controle do ciclo celular.

As alterações genômicas encontradas neste estudo, incluindo ganhos em 3q, 5p, 8q, 9q e 11q e, perdas em 3p, 5q, 8p, 9p e 18q, foram identificadas como alteradas em diversos estudos de CE de cabeça e pescoço (revisado por Leemans *et al.*, 2011).

As alterações envolvendo o cromossomo 3 foram observadas em todos os casos. Vinte e seis casos apresentaram perda em 3p26.3-p11.1; 18 casos apresentaram ganho em 3q11.2-q29; e 24 casos apresentaram ganho somente em 3q25. Dentre as alterações envolvendo 3q, duas delas estavam presentes em 15 casos (3q11.2-q29 e 3q25). Klussmann *et al.* (2009) analisaram 60 pacientes com CE de orofaringe, por CGH cromossômico, e identificaram perdas em 3p e ganhos em 3q em 57% e 72% dos casos, respectivamente. Os casos envolvidos em ganhos apresentaram associação significativa com estadios T avançados (tamanho do tumor). Seis casos apresentaram ganhos em 3q26.3-qter independente do padrão de infecção pelo HPV. Nesta região estavam mapeados, entre outros, os genes, *PIK3CA*, *TP63*, *TERC*, *DCUN1D1*, *LAMP3*, e *RPL35A*. Na presente casuística mais de 85% (28) dos casos apresentaram estágio clínico avançado (3 e 4), e desses, 24 casos apresentaram ganhos em 3q. Entre os casos com ganhos em 3q, pelo menos 19 deles apresentaram alterações que compreendem os genes *TERC* (19 casos), *PIK3CA* (20 casos), *RPL35A* (21 casos), *DCUN1D1* e *LAMP3* (22 casos), e *TP63* (23 casos), independente do padrão de infecção pelo HPV. Assim, considerando esse dado, não é possível estabelecer se o envolvimento de ganhos/amplificações em 3q observados no nosso estudo está associado a características de pior prognóstico, como relatado por outros autores. Pathare *et al.* (2009) analisaram 97 carcinomas orais por CGH cromossômico visando a identificação de vias de progressão nesses tumores e determinaram que as perdas em 3p (~50% dos casos) estavam relacionados à eventos iniciais de tumorigênese. Nesse mesmo ano, Smeets *et al.* (2009) analisaram 39 carcinomas de orofaringe por CGH-array e identificaram perda em 3p e ganho em 3q em aproximadamente 80% dos casos. Dados em literatura apontam que a perda no braço curto do cromossomo 3 é um evento precoce associado ao risco de progressão das lesões pré-malignas para carcinomas orais (Roz *et al.*, 1996; Garnis *et al.*, 2004).

Algumas das anormalidades aqui detectadas também foram relatadas por outros autores. Baldwin *et al.* (2005) e Sparano *et al.* (2006) identificaram perdas em 3p e ganhos em 3q, assim como os achados desse estudo (informações detalhadas na Tabela 1, página 14). Recentemente, Ambatipudi *et al.* (2011) analisaram 60 CEs

orais, por CGH-*array*, e relataram perdas em 3p14.2 (55% dos casos) e ganhos em 3q (60% dos casos). Os autores encontraram ganhos focais em 3q27.1 e perdas em 3p25.2-p26.3, que não foram previamente descritas. Os ganhos em 3q27.1 envolveram os oncogenes *ABCC5*, *ALG3*, *AIF4G1* e *EPHB3*. Os autores também relataram uma perda focal envolvendo o gene *RAD18*, o qual tem um importante papel na recombinação homóloga e reparo de dupla fita de DNA. Outras perdas em 3p envolveram o gene *PTPRG* (3p14.2), um supressor tumoral que age inibindo o crescimento tumoral por suprimir a ciclina D1.

O'Regan *et al.* (2006) detectaram perda em 3p e ganho em 3q em pacientes com idade superior à 40 anos, semelhante ao presente estudo, o qual compreende mais de 90% de pacientes >40 anos. Bauer *et al.* (2008) identificaram associação entre a perda em 3p e uma menor sobrevida. No presente estudo, não foi possível a análise de sobrevida.

Na análise de alterações no número de cópias associadas ao HPV, Jung *et al.* (2010) relataram tanto perda quanto ganho em 3p, sendo o ganho presente exclusivamente nos pacientes HPV negativos. No presente estudo, doze casos apresentaram ganhos em regiões distintas de 3p, sendo elas preferencialmente observadas nos pacientes HPV negativos (>58%), assim como descrito previamente.

Nas regiões 3p26.3-p11.1 (perda em 26 casos) e 3q11.2-q29 (ganhos em 18 casos) foram detectados 527 e 616 genes alterados, respectivamente. Na região 3q25.1 (ganhos em 24 casos) foram identificados nove genes alterados, entre eles *RNF13*, *PFN2*, *TSC22D2*, *SERP1*, *EIF2A*, *SELT*, *FAM194A*, *SIAH2*, *CLRN1*. O gene *RNF13* (do inglês *RING finger protein 13*) codifica uma proteína transmembrana tipo RING E3 ubiquitina ligase. Segundo Jin *et al.* (2011), esse gene desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças humanas, como câncer, e no controle da proliferação e diferenciação celular por meio da ubiquitinação de proteínas, que são importantes na regulação de respostas a sinais extracelulares, como miostatina e tenascina. A miostatina, membro da família do fator de crescimento B, inibe a proliferação e a diferenciação de células musculares (McPherron *et al.*, 1997; Lee, 2004). A tenascina, glicoproteína da matriz extracelular, foi associada à proliferação descontrolada e metástase (Scheetz e Lloyd 2000; Orend e Chiquet-Ehrismann, 2006). A expressão aumentada da proteína RNF13 foi identificada em diversos tumores malignos, entre eles o câncer de cólon, ovário, células basais, pâncreas e

melanoma (Jin *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2009) identificaram expressão protéica aumentada de RNF13 em lesões pré-malignas e malignas de pâncreas, sugerindo o envolvimento desse gene na proliferação e progressão da doença.

As alterações no cromossomo 3 podem contribuir efetivamente para o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço, incluindo os carcinomas de orofaringe. Estas anormalidades frequentemente reportadas por vários autores, algumas vezes mostram associação significativa a características particulares enquanto outros relatos não encontram qualquer associação significativa. De qualquer forma, considerando a frequência destes eventos, acredita-se que essas alterações podem ser decorrentes de instabilidade genômica gerada a partir de um significativo número de regiões que frequentemente passam por eventos de recombinação. No *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/> - Hg18) estão descritas mais de 2.000 CNVs mapeadas no cromossomo 3, compreendendo 646 alterações “comuns”.

Vinte e quatro pacientes apresentaram alterações no cromossomo 5. Vinte e um casos apresentaram ganhos em 5p15.33-p11 envolvendo em 154 genes. Baldwin *et al.* (2005) relataram ganhos em 5p15.2 em 45% dos casos analisados. O gene *TRIO* (do inglês *triple function domain*) está entre os alterados nessa região. A proteína por ele codificada atua como modulador de citoesqueleto ativando as vias Rho e Rac (Lane *et al.*, 2008). Além disso, desempenha um importante papel na migração de células neuronais e motilidade celular (Bateman e van Vactor, 2001) e na regulação da adesão (Medley *et al.*, 2003). Esse gene está amplificado em tumores malignos de pulmão e bexiga (Zheng *et al.*, 2004; Coe *et al.*, 2005; Garnis *et al.*, 2004). Sparano *et al.* (2006) identificaram ganhos em 5p15.33 e 5p13.1-5p13.2, presentes em 38% dos casos de carcinomas orais.

Ambatipudi *et al.* (2011) também detectaram ganhos em 5p15.33-p11 e 5p15.33 em 50% dos casos de cavidade oral analisados. Os autores relataram a presença de 24 oncogenes envolvidos na região alterada, entre eles o *PDCD6*. No presente estudo, 11 dos 21 casos apresentaram ganhos em 5p, sendo quatro deles com alto nível de ganho genômico. Esse dado confirma o potencial oncogênico desse gene que, de acordo com a literatura, contribui para o desenvolvimento e a expansão tumoral (Ia Cour *et al.*, 2008).

Em 16 casos do presente estudo, foram identificadas perdas genômicas em várias regiões do braço longo do cromossomo 5 (em Suplementos, Tabela Suplementar 2). Essa alteração também foi relatada em aproximadamente 50% dos casos por Baldwin *et al.* (2005) na avaliação de 20 carcinomas de cabeça e pescoço por CGH-*array*.

Klussmann *et al.* (2009) utilizaram CGH cromossômico em 29 carcinomas de orofaringe HPV 16 positivos e 31 casos HPV negativos e relataram a perda em 5q nos dois grupos: 32% nos casos HPV positivos e 44% nos casos negativos. Os dados do presente estudo são concordantes a estes achados, no qual 11/16 casos HPV negativos apresentaram essa alteração *versus* 4/16 casos HPV positivos.

Segundo Wreesmann *et al.* (2004), a perda em 5q11-q15, observada na maioria dos 82 CCPs, foi associada a pior prognóstico da doença independente do estágio TNM (Curvas de *Kaplan-Meier*, sobrevida específica da doença). Estes dados demonstraram que pacientes em qualquer estágio que apresentaram a alteração em 5q (entre outras) foram significativamente piores do que os pacientes sem essas alterações. Os resultados do presente estudo demonstraram perdas em várias regiões de 5q em mais de 25% dos casos, sendo que metade dessas alterações em 5q envolvem a região 5q11-q15, porém não associadas significativamente ao pior prognóstico. Esse resultado, aliado aos demais estudos, demonstram que a utilização de preditores genômicos associados à avaliação clínica pode aumentar a acurácia preditiva para os tumores de cabeça e pescoço, em um subgrupo específico.

No cromossomo 7 foram encontradas cinco alterações envolvendo 7p (em 15 casos) e 11 envolvendo 7q em 22 dos 32 casos de CE de orofaringe avaliados no presente estudo (Suplemento, Tabela Suplementar 2). Treze casos apresentaram alterações envolvendo tanto 7p quanto 7q. Em 7p, foram detectados somente ganhos genômicos, que compreendem um total de 251 genes, enquanto em 7q foram observados tanto ganhos quanto perdas genômicas, totalizando 239 e 212 genes, respectivamente. Smeets *et al.* (2009), ao investigarem alterações genômicas em amostras de pacientes com CE oral e de orofaringe, verificaram no grupo caracterizado com altos níveis de alterações a presença de ganhos em 7q em mais de 50% dos casos. No presente estudo, 16 dos 32 casos avaliados por CGH-*array* apresentaram ganhos em 7q.

Baldwin *et al.* (2005) utilizaram a plataforma *Whole genome tiling-path* (contendo 32433 BACs) e relataram que ganhos em 7p11.2 (*EGFR*) estavam presentes em 40% dos CEs avaliados. Os autores relataram alterações não previamente descritas em 7p12.3-13, 7q21.2 (*CDK6*) e 7q35. O'Regan *et al.* (2006) avaliaram amostras de carcinomas orais por CGH-*array* e relataram ganhos em 7p nos pacientes com idade superior a 40 anos. Concordante com os achados do presente estudo, Ambatipudi *et al.* (2011) relataram ganho em 7p em 50% dos carcinomas orais avaliados. No presente estudo, ganhos envolvendo o gene *EGFR* mapeado em 7p foram verificados em 6 casos, todos os pacientes tinham idade superior a 40 anos. As alterações em 7p compreenderam 15 dos 32 casos de carcinoma de orofaringe avaliados (~48%).

Vinte e cinco casos apresentaram perdas em 8p (19 casos especificamente em 8p23.3-p12) e 26 casos apresentaram ganhos em 8q11.1-q24.3, sendo que 21 casos apresentaram as duas regiões alteradas. Em 8p foram detectadas três alterações, uma perda em 8p23.3-p12 e dois ganhos em 8p12 e 8p12-p11.1, envolvendo 250, 2 e 62 genes, respectivamente. O ganho em 8q11.1-q24.3 envolveu 452 genes alterados, entre eles o oncogene *c-MYC*. Dados em literatura apontam o frequente envolvimento de alterações envolvendo 8p e 8q em CCP, com variações nessa frequência segundo a localização do tumor e tipo de alteração. Há relatos de ganhos em 8q em mais que 33% dos casos de carcinomas de orofaringe (Klussmann *et al.*, 2009); ganhos em 8q foram relatados em mais que 50% em amostras de carcinomas orais e de orofaringe, especificamente 80% em 8q24.13-q24.21 (Smeets *et al.*, 2009). Ganhos envolvendo 8p11.2-p11.1 (*FGFR1*) e 8q24.11-q24.13 (*MYC*) foram relatados em amostras de carcinomas orais (O'Regan *et al.*, 2006). A perda em 8p foi relatada em mais que 50% dos carcinomas orais assim como ganhos em 8q por Baldwin *et al.* (2005). Estes achados também foram detectados em carcinomas orais por Sparano *et al.* (2006): perdas em 8p estavam presentes em 40% dos casos e ganhos em 8q em mais que 35% dos casos. Usando CGH cromossômico em 97 carcinomas orais para a construção de modelos de redes de eventos genéticos, Pathare *et al.* (2009) relataram perdas em 8p (48%) e ganhos em 8q (72%) como anormalidades recorrentes.

No presente estudo, 19 casos de CE de orofaringe apresentaram ganhos em 8q, mais especificamente em 8q24.21, onde se mapeia o oncogene *c-MYC*. Desses dezenove casos, 5 são HPV positivos (>26%). Dentre os sítios de integração para os

HPVs descritos, a região cromossômica envolvendo o gene *c-MYC* é um dos locais de inserção mais recorrentes descritos em carcinomas cervicais, resultando na amplificação desse proto-oncogene e de genes proximamente mapeados, tanto na sequência de DNA viral quanto no DNA celular (Peter *et al.*, 2010). Esse pode ser um dos mecanismos pelo qual a região 8q encontra-se com ganhos nos tumores associados ao HPV. Entretanto, como a maior parte dos casos em que o oncogene *MYC* está envolvido em ganhos refere-se a tumores HPV negativos, acredita-se que esse evento é de importância nos carcinomas de orofaringe independente do padrão de infecção pelo HPV.

Da mesma maneira, o gene *FGFR1*, mapeado em 8p12, apresentou-se com ganho em 12 dos 32 casos avaliados por CGH-*array*. Em conjunto, estes resultados sugerem que alterações envolvendo perdas em 8p e ganhos em 8q são achados frequentes em literatura e devem ser eventos primários na carcinogênese de cabeça e pescoço.

No estudo de Ambatipudi *et al.* (2011) em 60 amostras de carcinomas orais avaliados por aCGH, foram relatadas perdas em 8p (83%) e ganhos em 8q (73%). Entretanto, estas regiões não foram associadas à recorrência loco-regional e sobrevida diminuída. As regiões de ganhos em 11q22.1-q22.2 e perdas em 17p13.3 e 11q23-q25 foram relacionados a características de pior prognóstico. Recentemente, Pathare *et al.* (2011), usando CGH cromossômico, relataram correlação entre as perdas em 8p e comprometimento linfonodal ($p \leq 0,04$), correlação esta não observada na presente casuística.

Alterações no cromossomo 11 foram frequentemente detectadas no presente estudo. Ganhos em 11q13.1-13.3 estavam presentes em 16 casos de CE de orofaringe (p -valor $< 0,05$), envolvendo 126 genes, entre eles a *CCND1* (*ciclina D1* - presente em 13 dos 16 casos). Essa alteração foi previamente descrita, sendo relacionada à carcinomas de cabeça e pescoço sem associação com HPV (Klussmann *et al.*, 2009, Smeets *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2010, Ambatipudi *et al.*, 2011), baixa sobrevida global (Pathare *et al.*, 2011) e pacientes com idade superior a 40 anos (Baldwin *et al.*, 2005; O'Regan *et al.*, 2006). Todos os relatos mostraram que a frequência de alterações envolvendo o cromossomo 11 eram superiores a 30% dos casos.

Ganhos envolvendo o gene *CTTN* (*cortactina* - 11q13.1-13.3) foi detectado em 11 dos 16 casos de carcinoma de orofaringe que apresentaram alterações em 11q (>68%). Recentemente, Ambrosio *et al.* (2011) avaliaram a expressão gênica e proteica do *CTTN* entre o fronte e a superfície de invasão em carcinomas epidermóides de laringe, relatando o aumento de expressão do transcrito e da proteína. O aumento da expressão da proteína citoplasmática foi detectado em 80% dos casos, correlacionado com invasão perineural. A expressão dessa proteína pode ser um importante marcador de pior prognóstico nos fronts de invasão dos CE de laringe, pela associação desse gene com a agressividade tumoral. Em tumores de orofaringe, ganhos da *CTTN* podem estar relacionados à agressividade tumoral.

Perdas genômicas envolvendo o cromossomo 19, especificamente em 19q13.41, foram verificadas em 34% dos casos. Embora o cromossomo 19 seja rico em CNVs comuns, as perdas genômicas detectadas em 19q13.41 não coincidiram com CNVs comuns e podem ter relevância no processo tumoral.

A maior frequência de alterações nesse estudo envolveu a perda do cromossomo Y em 50 a 68% dos casos avaliados, dependendo da região alterada. Essas perdas envolveram as regiões Yp11.2-q11.221, Yq11.222-q11.223 e Yq12. Perdas no cromossomo Y foram relatadas em mais de 30% dos casos não associados ao HPV, em um recente estudo de Klussmann *et al.* (2009). As alterações nesse cromossomo foram propostas como um dos mecanismos genéticos de predisposição masculina ao desenvolvimento de CECP (Kujawski *et al.*, 2004). No presente estudo, essa alteração também não se mostrou associada à infecção pelo HPV, estando presente tanto no grupo positivo quanto no negativo.

Genes funcionais mapeados no cromossomo Y podem ser divididos em três grupos distintos. O primeiro consiste em genes idênticos nos cromossomos X e Y, localizados na região pseudoautossômica, incluindo aqueles que desempenham um papel nas vias metabólicas para o provimento de energia celular e expressão do antígeno de superfície celular. Evidências recentes sugerem a presença de dois miRNAs mapeados na região pseudoautossômica (Yuan *et al.*, 2011). O segundo grupo possui genes homólogos aos do cromossomo X, porém não idênticos, localizados na região não recombinante do cromossomo Y (NRY) ou na região do cromossomo Y específica do sexo masculino (MSY). As regiões pseudoautossômicas apresentam 19 genes codificadores e a região eucromática MSY tem 78 genes

(Skaletsky *et al.*, 2003). O terceiro grupo inclui genes da região não-recombinante, como *SRY* (região determinante do sexo Y).

Com exceção da região *SRY*, o cromossomo Y é considerado um cromossomo com baixa densidade gênica. No entanto, estudos recentes tem demonstrado o envolvimento do cromossomo Y em várias doenças, incluindo o desenvolvimento de tumores em homens, como gonadoblastoma e câncer de próstata (Lau, 1999). Os genes mapeados no cromossomo Y podem influenciar a proliferação celular e transdução de sinal, ou podem regular a expressão gênica pela associação à mRNA específicos. Em geral, os genes mapeados no cromossomo Y são candidatos para a ativação da oncogênese humana. Recentemente, Singh *et al.* (2011) demonstraram o potencial de transcrição de todos os genes codificadores de proteínas no cromossomo Y, incluindo o *SRY* e o oncogene *TSPY* pela análise epigenômica em larga escala. O locus *GBY* pode ser hipometilado no gonadoblastoma resultando no aumento de expressão dos genes *TSPY* e *TTY* (Jiang *et al.*, 2008; Irizarry *et al.*, 2009). Apesar de terem sido observadas alterações recorrentes no cromossomo Y, não foi detectado aqui o envolvimento dos genes *TSPY* e *TTY*. No entanto, o significado da perda do cromossomo Y no desenvolvimento ou na progressão destes tumores ainda é desconhecida.

No presente estudo foi observada uma média de ~101 alterações por caso (desvio padrão= ± 62). Algumas alterações genômicas coincidiam com CNAs detectadas em um conjunto de amostras de indivíduos saudáveis da população brasileira, a qual apresentou $6,8 \pm 3,7$ CNAs por indivíduo. Após a exclusão das alterações comuns entre os grupos, cinco casos apresentaram um número pequeno de alterações (variando entre 9 a 35 CNAs) e, entre eles três casos eram HPV positivos, dois do subtipo HPV16 e um HPV18 (FAR10T: 15 CNAs, FAR7T: 18 CNAs e FAR9T: 35 CNAs). Estudos recentes demonstraram a presença de um grupo de tumores geneticamente “silenciosos” (com pouquíssimas CNAs) em casos HPV negativos, sendo significativamente associados com maior sobrevida, ausência de mutações em *TP53*, menor consumo de álcool e maior incidência em indivíduos do sexo feminino. Interessante ressaltar que dois casos com um pequeno número de CNAs avaliados nesse estudo, FAR3T (9 CNAs) e O-11 (23 CNAs) são tumores HPV negativos com ausência alterações no gene *TP53*, porém ambos do sexo masculino e consumidores de tabaco e álcool.

Neste e em outros estudos, diversas alterações genômicas também foram reportadas nos CECP, demonstrando alta instabilidade genômica que pode estar associada a um pior prognóstico (Boehmühl *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2008; Pathare *et al.*, 2011). Boehmühl *et al.* (2000) relataram, em um estudo de CGH cromossômico, ganhos em 2q12, 3q21-29, 6p21.1, 11q13, 14q23, 14q24, 14q31, 14q32, 15q24, 16q22, e perdas em 8p21-22 e 18q11.2 na análise de 113 CECPs primários. Essas associações foram significativas tanto com o menor intervalo livre de doença quanto menor sobrevida global. Utilizando CGH-array (CodeLink, GE Healthcare) em 117 CECPs (sendo 44 de orofaringe), Bauer *et al.* (2008) relataram alterações envolvendo 1q43, 16q23-24 e 18q22. Esses achados foram correlacionados significativamente com doença livre loco-regional. Tanto ganhos cromossômicos em 1q e 16q quanto perda em 18q foram associados a pior prognóstico. No atual estudo, foram identificadas regiões alteradas exclusiva ou preferencialmente nos pacientes com resposta parcial ao tratamento e doença progressiva, entre elas as perdas em 1p21.3-p21.2, 1p21.2-p21.1 e 1p21.1 e ganhos em 10p13-p12.33 e 10p12.31-p12.1 ($P \leq 0,017$). Essa análise foi possível em apenas vinte e dois casos do presente estudo, no qual todos receberam carboplatina associada à radioterapia. Essas alterações exclusivas dos tumores de pior prognóstico podem ser potenciais marcadores associados à resposta ao tratamento.

Recentemente, Pathare *et al.* (2011) avaliaram alterações genômicas em 97 carcinomas orais por CGH cromossômico. Os autores concluíram que ganhos em 11q13 e perdas em 18q são preditores de pior prognóstico, mostrando associação significativa com diminuição na sobrevida. Tanto ganhos em 11q13 quanto perdas em 18q foram verificadas no presente estudo. O tempo de seguimento dos pacientes, ainda é pequeno para análise de sobrevida.

Frequentemente, as neoplasias orais são tratadas primariamente por cirurgia, enquanto as localizadas na orofaringe são tratadas por quimioterapia e radioterapia (van den Broek *et al.*, 2009), sendo a resposta completa de quimio e radioterapia combinada superior à radioterapia isolada (Calais *et al.*, 1999; Denis *et al.*, 2004). O *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomenda esta estratégia no tratamento do câncer de orofaringe avançado (NCCN, 2008). Porém, o tratamento concomitante de quimioterapia e radioterapia não é efetivo em todos os pacientes,

apresentando efeitos colaterais e toxicidade (van den Broek *et al.*, 2009), ou seja, ainda com limitações.

Atualmente, as estratégias terapêuticas se baseiam em critérios clínicos e histopatológicos, como a classificação TNM. A resistência às drogas pode ser mediada por várias alterações genéticas. Entretanto, os possíveis marcadores biológicos que poderiam prever a resposta à terapia convencional, melhorando o prognóstico, ainda não estão totalmente elucidados. Vários estudos estão sendo realizados com intuito de se determinar marcadores específicos para cada tumor, com a finalidade de otimizar protocolos de tratamento baseados em características genéticas e biológicas que poderiam, assim, levar a uma maior sobrevida e menor morbidade (Akervall *et al.*, 2004).

Em um estudo “*in vitro*”, Akervall *et al.* (2004) compararam o perfil genético e de expressão em linhagens celulares de CECP (laringe, cavidade oral e orofaringe) sensíveis e resistentes à cisplatina pelas técnicas CGH, análise cariotípica e de expressão gênica global. As linhagens de células resistentes à cisplatina apresentaram significativamente mais alterações genômicas (perdas e ganhos) e anormalidades cromossômicas complexas comparadas às células sensíveis. Aproximadamente 60 genes foram identificados e distinguiram os dois grupos estudados, entre eles estavam incluídos genes envolvidos na proliferação, metástase e resistência a droga, como *TIMP-2*, *CAVEOLIN-2*, *PRAME* e *DAP*. O oncogene *MET* teve expressão aumentada na linhagem de células resistentes à cisplatina. Seu produto atua nos processos celulares envolvendo proliferação, mitogênese, angiogênese e metástase.

Além do oncogene *MET*, os demais descritos também mostraram-se alterados quanto ao número de cópias no presente estudo. Foram observados cinco casos com ganhos onde se mapeia o oncogene *MET*, sendo que dois deles (O-02 e 1025726) apresentaram resposta parcial ao tratamento com cisplatina. Esses dados evidenciam um possível papel de resistência ao quimioterápico utilizado. Um caso com ganho nesse gene (1026835) foi perdido o seguimento clínico.

Van den Broek *et al.* (2007) ao investigar as anormalidades genéticas associadas ou não a resistência à quimioterapia associada a radioterapia, não verificaram diferença significativa no número total de alterações cromossômicas (227 *versus* 231). Quarenta pacientes com CECP, incluindo a região de orofaringe, foram

avaliados e, nos casos com resistência à terapia foi observada uma maior presença de altos níveis de amplificação. Ganhos localizados em 3q11-q13, 3q21-q26.1 e 6q22-q27 e perdas em 3p11-pter e 4p11-pter foram também associados à resistência ao tratamento. Essas regiões não estavam alteradas nos casos com resposta completa *versus* resposta parcial ao tratamento ou doença progressiva.

Neste estudo, foram encontradas alterações genômicas nos cromossomos 1, 9, 10 e 19, principalmente nos tumores que apresentaram resposta parcial ao tratamento ou doença progressiva. Entre essas alterações, as regiões de perdas 1p21.3-p21.2, 1p21.2-p21.1 e 1p21.1 e ganhos em 10p13-p12.22 e 10p12.31-p12.1 estavam alteradas exclusivamente nos casos que não apresentaram resposta ao tratamento proposto, sugerindo assim que estes pacientes não se beneficiaram com a estratégia terapêutica utilizada. A importância na determinação de marcadores biológicos de resposta ao tratamento está na possibilidade de estratificar pacientes a fim de evitar morbidades relacionadas a terapias potencialmente desnecessárias.

Dados recentes em literatura indicam que pacientes com tumores HPV positivos têm um melhor prognóstico e resposta ao tratamento comparado àqueles negativos (Licitra *et al.*, 2006; Weinberg *et al.*, 2006; Fakhry *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009; Lassen *et al.*, 2010). Tem sido demonstrado um resultado superior na resposta ao tratamento nos pacientes com tumores associados ao HPV TP16-positivos quando tratados com radioterapia isolada (Lassen *et al.*, 2009). Lassen *et al.* (2010) avaliaram estratégias terapêuticas distintas (RT+nimorazol *versus* RT+placebo) baseadas na infecção por HPV e no status de TP16 em 331 CCPs, dos quais 143 eram de orofaringe. O efeito positivo do *status* de TP16 sobre o prognóstico da doença após a radioterapia sugere que tumores HPV positivos podem ser mais radiosensíveis que os tumores HPV negativos (Lassen *et al.*, 2010). No presente estudo, os dados da resposta ao tratamento são obtidos ao final da quimioterapia e radioterapia. Dentre os pacientes com resposta completa total ou parcial, 85% deles (11/13) apresentaram associação concomitante com HPV16 e ou 18. Os mecanismos biológicos que explicam a resposta aparentemente melhor à radioterápicos em tumores HPV positivos ainda não foram completamente elucidados (Lassen *et al.* 2010).

No estudo de Lindel *et al.* (2001), o efeito da infecção do HPV na resposta à radioterapia foi avaliado em 139 carcinomas de orofaringe, os quais também

obtiveram melhores resultados clínicos nos casos HPV positivos, como controle regional e sobrevida global, resultante de um aumento na sensibilidade à radioterapia. Em resumo, nossos dados corroboram os achados da literatura apontando que a positividade para o HPV confere uma melhor resposta a terapia.

Em outro estudo, Fischer *et al.* (2010) analisaram o efeito da expressão da proteína TP16 (correlacionado com HPV positivo) no prognóstico de carcinomas de orofaringe tratados por radioterapia ou cirurgia primária. Os pacientes com carcinomas de orofaringe positivos para TP16 apresentaram significativamente maior sobrevida global do que os TP16 negativos ($p=0,007$). Os carcinomas associados ao HPV são caracterizados pelo aumento da expressão da proteína supressora tumoral TP16 (codificada pelo gene *CDKN2A*) devido à inativação funcional da pRB pela transcrição do oncogene E7 do HPV (Fakhry *et al.*, 2008; Licitra *et al.*, 2006; Weinberg *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009; Lassen *et al.*, 2010).

No atual estudo, não foi avaliada a expressão da proteína TP16, porém foram observados, pela metodologia de CGH-array, perdas do gene *CDKN2A* em 17 dos 32 casos (53%), sendo que desses, 88% (15/17 casos) eram negativos para HPV16. Estes achados são concordantes com os descritos por O'Regan *et al.* (2006), que relataram perdas nesse gene nos casos de carcinoma de cavidade oral com idade superior a 40 anos, não associado à infecção por HPV.

Recentemente, Tribius *et al.* (2011) revisaram oito *clinical trials* para avaliar o impacto da infecção do HPV no tratamento dos carcinomas de orofaringe, sete deles apresentaram sobrevida significativamente aumentada em pacientes HPV positivos comparados aos negativos. No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os casos HPV+ e HPV- tratados com radioterapia associada à carboplatina, apesar dos casos HPV+ apresentarem melhor resposta ao tratamento. Entretanto, o estudo ainda não está completo e a inclusão de novos casos e maior seguimento clínico poderá dar evidências adicionais do papel da infecção do HPV, resposta ao tratamento e sobrevida global.

Em relação à análise de sobrevida global deste estudo (teste de *Kaplan-Meier*), os pacientes tratados com radioterapia associada à carboplatina não apresentaram diferença significativa entre os casos HPV+ e HPV-, apesar dos casos HPV+ apresentarem melhor resposta ao tratamento. Além disso, foi verificada uma relação

significante entre os pacientes com resposta completa e parcial ao tratamento com carboplatina e doença progressiva ($P=0,018$).

Comparados com os tumores de cabeça e pescoço HPV negativos, os tumores HPV positivos apresentam um número menor de alterações no número de cópias de DNA, menor nível de hipometilação no genoma como um todo, menor frequência de mutações em *TP53* e expressão diminuída de *EGFR* (Kumar *et al.*, 2008; Westra *et al.*, 2008; Gillison *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2009). Nossos resultados confirmam parcialmente estes dados tendo sido detectada perdas envolvendo *TP53* em 14 de 32 casos, sendo que quase 65% desses casos eram HPV negativos. A perda envolvendo o gene *EGFR* foi verificada em dois de 32 casos, um deles era HPV negativo. Estas alterações necessitam ser confirmadas por outros métodos de análise.

A expressão das oncoproteínas do virais E6 e E7 não é suficiente para causar a progressão maligna ou a transformação oncogênica (revisado por McLaughlin-Drubin e Munger, 2009), porém, os eventos genéticos adicionais específicos que são requeridos para o desenvolvimento dos carcinomas continuam desconhecidos. Além disso, não se sabe se estes eventos são especificamente associados aos carcinomas de orofaringe ou todos os cânceres associados ao HPV (como o cervical, vulvar, vaginal, anal, peniano e, inclusive, o de orofaringe) (Chung e Gillison, 2009).

No presente estudo, foi realizada a comparação do padrão de alterações genômicas entre os casos HPV positivos (12) e os negativos (20). Os tumores HPV positivos apresentaram um perfil genômico contendo um menor número de alterações (73 CNAs/caso) quando comparados a casos HPV negativos (117 CNAs/caso), concordante com os dados da literatura (Klussmann *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2010). Nos casos HPV positivos foi observado um maior número de perdas genômicas com relação a ganhos (42 *versus* 31, respectivamente); o inverso foi observado nos casos HPV negativos, ou seja, uma maior prevalência de ganhos comparados às perdas (60 *versus* 57, respectivamente), porém nenhuma alteração foi significativa ($P>0,05$).

Smeets *et al.* (2006) mostraram que tumores HPV negativos apresentam exclusivamente perdas em 3p11.2-26.3, 5q11.2-35.2 e 9p21.1-24, e ganhos ou ampliações em 11q12.1-13.4, alterações estas que estão ausentes nos tumores HPV positivos. Interessantemente, ganhos em 18q12.1-23 estão presentes nos tumores

HPV positivos, enquanto essa mesma região estava perdida nos tumores HPV negativos (Smeets *et al.*, 2006). Concordante com os dados apresentados, no presente estudo a perda em 18q12.2 foi exclusiva dos tumores HPV negativos, presentes em 35% dos casos do presente estudo.

Mais recentemente, Jung *et al.* (2010) avaliaram a presença e o genótipo dos HPVs e a transcrição do RNA de E6/E7 em 231 carcinomas de cabeça e pescoço (138 de orofaringe ou base de língua e 93 de hipofaringe ou cavidade oral). Foi analisada a relação entre os subtipos de HPVs e as características clínicas e histológicas, além de alterações genéticas por CGH-*array* e o perfil de expressão gênica por *microarrays* entre pacientes HPV negativos e aqueles que expressam os transcritos E6/E7. Por CHG-*array*, oito carcinomas de orofaringe HPV positivos e com expressão de E6/E7 foram comparados com 83 tumores HPV negativos (30 deles de orofaringe: 24 positivos e 6 negativos). Os tumores HPV positivos possuíam menos número de alterações genéticas que são comuns nos tumores HPV negativos, como amplificações em 11q13 e 3p25 e perda em 9p21 e 3p. Quando comparados com os tumores exclusivamente da orofaringe, os tumores HPV positivos apresentaram perda em 16q22-q24 e diminuição da expressão dos 12 genes mapeados nessa região. No presente estudo, não foi detectada alteração diferencial envolvendo o cromossomo 16 entre os casos HPV positivos e negativos.

Este estudo também permitiu a identificação de regiões genômicas capazes de diferenciar os tumores com e sem infecção por HPV ($P < 0,05$). No total foram encontradas 199 regiões alteradas, nas quais 96 CNAs foram exclusivas dos casos HPV negativos e apenas três CNAs foram exclusivas dos casos HPV positivos. As alterações encontradas nas regiões 7q22.1 (10 genes) e 14q12 (dois genes) apresentaram-se perdidas exclusivamente nos tumores HPV positivos ($P = 0,044$).

A perda genômica envolvendo 7q22.1 incluem os genes *ORAI2*, *ALKBH4*, *LRWD1*, *POLR2J*, *POLR2J3*, *SPDYE2*, *SPDYE2L*, *RASA4*, *UPK3B* e *POLR2J2* e as perdas em 14q12 envolveram os genes *NOVA1* e *PRKD1*. Wentzensen *et al.* (2004) relataram dois sítios de integração do HPV no genoma próximos a 14q12 (há mais de 190 *loci* de integração descritos). Estes sítios descritos em carcinomas cervicais incluem um mapeado em 14q (CSCC1), o qual parece estar relacionado com a integração do HPV16, e o sítio em 14q13 (int55), que parece estar relacionado com a integração do HPV18. Porém, essas regiões não estavam alteradas no presente

estudo, apesar de alguns relatos mostrarem a coincidência de sítios frágeis e sítios de integração dos HPVs (Wilke *et al.*, 1996; Thorland *et al.*, 2000; Ferber *et al.*, 2003).

Uma possível razão da progressão tumoral depois da integração do HPV de alto risco são as alterações estruturais do genoma viral que levam a expressão alterada dos oncogenes virais, resultando em uma pressão seletiva neoplásica adicional (Wentzensen *et al.*, 2004). A integração viral também é facilitada por processos de reparo ativado nas células cromossomicamente instáveis.

Foram identificadas alterações genômicas complexas presente nos carcinomas de orofaringe, além de perfis genômicos diferenciais entre os grupos com resposta completa e parcial no tratamento dos carcinomas de orofaringe e segundo o padrão de infecção pelo HPV. Esses achados foram corroborados com as análises de expressão gênica global.

2. Expressão Gênica Global

A expressão gênica global dos 22 casos de carcinoma de orofaringe revelou 1463 genes diferencialmente expressos com função conhecida, sendo 717 com aumento e 746 com diminuição de expressão gênica. Relatos de expressão gênica global em carcinomas de cabeça e pescoço são frequentes em literatura, entretanto, em geral, os autores não usam amostras de sítios específicos, incluindo tumores de todas as localizações num único grupo (ver Tabela 2, página 19).

Para o nosso conhecimento, apenas dois estudos avaliaram exclusivamente tumores de orofaringe: Martinez *et al.* (2007) que investigaram 3 carcinomas de orofaringe HPV positivos e 4 HPV negativos; e Jung *et al.* (2010) que analisaram 48 casos utilizando a plataforma da *Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 GeneChip Arrays*. Três outros estudos também tem em sua casuística tumores de orofaringe: Chung *et al.* (2006) que avaliaram 11 carcinomas de orofaringe entre 48 amostras estudadas; Slebos *et al.* (2006) que investigaram 9 carcinomas de orofaringe entre 36 amostras de cabeça e pescoço; e Lohavanichbutr *et al.* (2009) que avaliaram 31 carcinomas de orofaringe (23 HPV+ e 8 HPV-) entre 124 casos. Este último estudo realizou a análise em separado dos casos de orofaringe. A comparação com os dados publicados em carcinomas de orofaringe serão descritos em detalhes abaixo.

Semelhante ao presente estudo, Martinez *et al.* (2007) utilizaram também como estratégia a comparação entre carcinomas de orofaringe HPV positivos (três casos) e negativos (quatro casos) e quatro tecidos de mucosa oral normal. Os autores identificaram 124 genes com aumento de expressão e 42 com diminuição entre os casos HPV positivos e negativos, e um subgrupo de 60 genes diferencialmente expressos na comparação desse grupo e o tecido normal (sendo 41 genes com aumento de expressão, entre eles: *SYCP2* - estrutura nuclear e meiose; *RFC5* - reparo ao DNA; *ZNF238* e *DNMT1* - regulação da transcrição; e 19 genes com diminuição, entre eles: *KLK8* - proteólise e *CRABP2* - transdução de sinal). Esses resultados foram validados por RT-PCR quantitativa e revelaram padrões de expressão gênica específicos em carcinomas de orofaringe HPV positivos e negativos (Martinez *et al.*, 2007).

No presente estudo foram avaliados tanto os genes diferencialmente expressos com relação ao tecido normal quanto à infecção pelo HPV. Na análise supervisionada dos dados quanto à infecção por HPV, não foram identificados genes em comum com o estudo de Martinez *et al.* (2007). Dentre os genes diferencialmente expressos entre os tumores e os casos normais, os genes com aumento de expressão *THBS4* (adesão celular) e *PLA2G4C* (resposta imune) e com diminuição de expressão *KLK10* (diferenciação celular) também foram identificados no presente estudo.

Dentre os genes com aumento de expressão tanto no presente estudo, quanto no relato de Martinez *et al.* (2007), está *PLA2G4C*. Esse gene codifica a isoforma gama da fosfolipase A2 citosólica (PLA2G4C), que parece ser predominantemente expressa no coração e no músculo esquelético (Underwood *et al.*, 1998; Tews *et al.*, 2006). Outros autores demonstraram que esta enzima é constitutivamente expressa no retículo endoplasmático e desempenha um papel importante na remodelação e manutenção de fosfolipídios de membrana sob várias condições, incluindo stress oxidativo (Asai *et al.*, 2003; Tews *et al.*, 2006). Biologicamente, essa fosfolipase catalisa a hidrólise do glicerol, produz lisofosfolipídeos e libera ácido aracdônico (Kokoglu *et al.*, 1998). Elevadas quantidades desse ácido, que ativam os eicosanóides, estão presentes nos gliomas quando comparados aos tecidos normais, promovendo a sobrevivência celular, estimulando a proliferação e modulando a adesão celular (Capodici *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2001).

As alterações nos níveis de expressão de *KLK* foram reportadas em diversos tumores malignos, incluindo mama, próstata e ovário, e foram amplamente reportadas como marcadores moleculares (revisado em Borgono *et al.*, 2004; Clements *et al.*, 2004; Paliouras *et al.*, 2004; Pampalakis e Sotiropoulou 2007). Diversos membros da família das calicreínas foram propostos tanto como marcadores como potenciais alvos terapêuticos em diversos tumores malignos. O aumento de sua expressão pode elevar o potencial maligno tanto em experimentos “in vivo” quanto “in vitro” devido à associação da *KLK* com o comportamento maligno em múltiplos estágios da progressão tumoral, incluindo invasão, metástase e angiogênese (Borgono *et al.*, 2004; Clements *et al.*, 2004; Paliouras *et al.*, 2004; Pampalakis e Sotiropoulou 2007; Pettus *et al.*, 2009).

Pettus *et al.* (2009) avaliaram a expressão dos genes *KLKs* 5, 7, 8 e 10 utilizando tanto RT-PCR quantitativa quanto análise de imunoistoquímica. Os autores relataram que esses genes são abundantemente expressos em CE orais, o que pode fornecer um parâmetro clínico útil para a classificação molecular especificamente de carcinomas epidermóides.

Na análise de expressão gênica global em 48 carcinomas de orofaringe, Jung *et al.* (2010) detectaram a expressão aumentada de genes como *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CXCL11*, *CXCL9*, *IL15*, *TCAM1*, *TAF7L*, *SYCP2*, *STAG3*, *SYNGR3*, *RASIP1* e *ABCA17P* na comparação entre o grupo HPV positivo *versus* negativo. Por outro lado, foi relatada a diminuição da expressão gênica de *ANO1/TMEM16A*, *PPFIA1*, *GAL*, *CCND1*, *DHCR7*, *CTTN* (localizados na região 11q13), *MAGEA4*, *MAGEA12*, *HMGA2*, *MAGEA5*, *MAGEA11*, *CA12*, *CCNA1* e *CHRM3* nos tumores HPV positivo *versus* negativo, que são descritos em literatura como envolvidos em aumento de expressão em tumores HPV negativos. Os genes descritos nesse estudo como desregulados nos CECP HPV positivos também foram aqui identificados, como *CDKN2A* com aumento de expressão e *MAGEA5*, *CA12* e *GAL* com diminuição de expressão. O transcrito *MAGEA5* apresentou expressão diminuída em seis dos nove casos HPV positivos e com expressão normal em nove dos 13 casos HPV negativos. Da mesma maneira, foi verificada a diminuição da expressão do gene *GAL* em 78% dos tumores HPV positivos e 54% dos negativos.

Eventos mediados por *GAL* ocorrem por meio de seus receptores *GALR1*, *GALR2* e *GALR3*. Estudos prévios demonstraram que *GALR2* e ou *GALR3* são pró-

proliferativos (Knezevich *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2006). Em contraste, foi relatado que *GALR1* exerce efeitos antiproliferativos na regeneração das glândulas supra-renais e timócitos imaturos de ratos (Hochol *et al.*, 2000; Trejter *et al.*, 2002). A proliferação induzida por GAL pode ser delicadamente regulada pela relação dos receptores de galanina expressos em uma determinada célula. Em linhagens celulares de CE de esôfago e cabeça e pescoço, Sugimoto *et al.* (2009) sugeriram que a regulação do crescimento pode ser interrompida como resultado do aumento de expressão de *GAL* e expressão diferencial dos receptores de galanina. Assim, a proliferação celular poderia ser promovida pela sinergia da diminuição de expressão de *GALR1* e aumento da sinalização de *GAL* via *GALR2* ou *GALR3*. Além disso, a desregulação de proteínas de sinalização a jusante dos receptores também podem afetar esta regulação. No presente estudo, não foi verificada alterações na expressão dos receptores de *GAL*.

No estudo de Chung *et al.* (2006) foi descrita uma lista de 75 genes altamente preditivos de recorrência em 40 amostras de 29 pacientes (13 cavidade oral, 11 orofaringe e cinco laringe). Dentre os genes com aumento de expressão no grupo com recorrência, *KRT14*, *MMP2*, *SFN*, *LGALS1* foram associados a características de pior prognóstico previamente relatado pelos autores (Chung *et al.*, 2004). A comparação do perfil de expressão gênica entre os tumores de alto e baixo risco revelou que tumores de alto risco tem genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima desregulados, assim como aqueles envolvidos na sinalização de *NFKB* (*MYC*, *PTEN* e *HIFI-alpha*), importantes reguladores de crescimento celular e angiogênese. Entre a lista de genes alterados revelados por Chung *et al.* (2006), apenas três se correlacionaram positivamente com os resultados do presente estudo, entre eles *LGALS1*, *LOXL2* e *HLA-DPB1*.

Slebos *et al.* (2006) avaliaram 36 carcinomas de cabeça e pescoço incluindo nove carcinomas de orofaringe, sete destes eram HPV positivos. Foram detectados 91 genes diferencialmente expressos entre os tumores HPV positivos e negativos. Entre o grupo HPV positivo, *CDKN2A* foi relatado com aumento de expressão. Além dele, outros genes reguladores do ciclo celular (*p18* e *CDC7*), fatores de transcrição (*TAF7L*, *RFC4*, *RPA2* e *TFDP2*) e moléculas de adesão (*TCAM1*) estavam com aumento de expressão nos tumores HPV positivos. Apenas dois genes apresentaram expressão diminuída nesse grupo de tumores (*NAP1L2* e *KIRREL*). Dessa lista, o

CDKN2A estava diferencialmente expresso entre os tumores HPV positivos e negativos da presente casuística.

Entre os 466 genes diferencialmente expressos em carcinomas de orofaringe, Lohavanichbutr *et al.* (2009) relataram 299 significativamente diferenciais entre os carcinomas de orofaringe HPV positivos e negativos: 222 mostraram-se com aumento de expressão e 77 com diminuição de expressão. O aumento da expressão foi detectada em genes preferencialmente envolvidos na replicação do DNA, ciclo celular e proliferação celular como *RPA2*, *LIG1*, *POLD1*, *POLH*, *MCM2*, *MCM3*, *MCM7*, *NASP*, *CDC7*, *CCNE2*, *CDKN2A*, *CDK2*, *RBBP4*, *PCNA*, e *Ki67* nos tumores HPV positivos. Foi também relatada a diminuição da expressão dos genes envolvidos em mecanismos de reparo a danos no DNA como *XRCC1*, *DDB2*, *FANCG* e *TOPBP1*. Os genes *CCND1*, *APC* e *HIPK2* relacionados ao ciclo celular apresentaram diminuição da expressão. A comparação entre as listas de genes obtidas pelos autores com a do presente estudo foi concordante para *CDKN2A* e *STMN1* (aumento de expressão) e *OXCT1*, *MOAP1* e *RIT1* (diminuição de expressão gênica).

O gene *STMN1* codifica a estamina, uma proteína envolvida na regulação de microtúbulos, cujo aumento de expressão foi relacionado à menor sensibilidade ao paclitaxel em linhagens de câncer de mama (Alli *et al.*, 2002; Alli *et al.*, 2007). A proteína p53 regula o ponto G2/M do ciclo celular, reduzindo a expressão de estamina (Johnsen *et al.*, 2000). O aumento de expressão de *STMN1* em tumores HPV positivos foi relatado no estudo de Lohavanichbutr *et al.* (2009), os quais especularam que a inativação de p53 pela oncoproteína viral E6 dos HPVs de alto-risco poderia levar ao aumento da expressão de estamina, resultando em maior resistência ao paclitaxel comparado aos tumores de orofaringe HPV negativos, resultado esse não confirmado clinicamente.

Em contrapartida, alguns dos genes diferencialmente expressos entre tumores HPV positivos e negativos foram relatados como associados à quimiossensibilidade à cisplatina, 5-fluorouracil e paclitaxel, comuns agentes quimioterápicos usados no tratamento de CECP (Lohavanichbutr *et al.*, 2009), semelhante ao utilizado no presente estudo. Um estudo realizado em linhagens celulares de câncer de mama demonstraram que a linhagem de células que foi mais sensível à cisplatina expressava baixos níveis de ciclina D1, e as linhagens de células transfectadas com pequenos RNAs de interferência para ciclina D1 exibiram maior sensibilidade à cisplatina (Yde

e Issinger, 2006). Além disso, a cisplatina pode suprimir a expressão de *E6*, restaurar a função de TP53 e aumentar a radiosensibilidade em linhagens celulares de SiHa infectadas com HPV16/E6+ (Huang *et al.*, 2004). Lohavanichbutr *et al.* (2009) encontraram uma menor expressão de *CCND1* nos tumores de orofaringe HPV positivos, podendo ser esse um importante fator para determinar a maior sensibilidade à cisplatina nesses tumores comparados aos CEOs HPV negativos.

De acordo com os trabalhos em literatura, dentre os pacientes com resposta completa total ou parcial no presente estudo, 85% deles (11/13) apresentaram associação concomitante com HPV16 e/ou 18 porém, não foram verificadas alterações dos níveis de transcrito da *CCND1*. A diferença entre os resultados obtidos no presente estudo quando comparados aos demais da literatura, especificamente em carcinomas de orofaringe, é difícil principalmente considerando os delineamentos dos estudos, as plataformas usadas, assim como a análise estatística dos dados. Além disso, há um número limitado de casos de orofaringe publicados em literatura utilizando estas abordagens.

Os maiores *folds change* detectados na análise global de expressão gênica envolveram quatro genes não associados ao HPV: *TMPRSS11A* e *MAGEA9* (diminuição da expressão) e *FGF7* e *ONECUT2* (aumento da expressão gênica).

O gene *TMPRSS11A/ECRG-1* foi relatado como associado ao ciclo celular e na regulação do crescimento de carcinomas epidermóides de esôfago (Li *et al.*, 2011). Esse gene foi demonstrado como expresso em células do esôfago, fígado, cólon e pulmão, porém, em células tumorais (principalmente de CE de esôfago), foi demonstrada a diminuição dos seus níveis de expressão (Liu *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que a proteína ECRG1 é capaz de elevar os níveis proteicos de P15INK4b e induzir a parada do ciclo celular em G1/S por meio da associação com a proteína “zinc finger” 1 de interação com Myc em linhagem de células de esôfago EC9706 (Zhao *et al.*, 2004; Yueying *et al.*, 2008). Os dados do presente estudo demonstraram também o envolvimento deste gene em carcinomas de orofaringe.

Outro gene frequentemente detectado com diminuição de expressão na presente casuística foi o *MAGEA9*. Esse gene pertence à família dos antígenos câncer/testículo (do inglês *cancer-testis antigens* - CTAs), porém, *MAGEA9* possui função não redundante com outros CTAs, apresentando um padrão distinto de

expressão em células germinativas. Portanto, é possível especular que os tumores que expressam predominantemente *MAGEA9* podem ter um comportamento biológico distinto daqueles que expressam outros CTAs. Neste sentido, Picard *et al.* (2007) observaram a predominância da expressão de *MAGEA9* nos tumores de bexiga superficiais mais diferenciados, enquanto Fradet *et al.* (2005) relataram a expressão de outros CTAs como *1-NY-ESO*, *BAGE*, *MAGE-C1*, *SSX-2* e *-4* mais frequentes nos tumores invasivos pouco diferenciados. Além desses tumores, a expressão desse gene já foi descrita em carcinomas de células renais (Oehlrich *et al.*, 2005) linfomas cutâneos de células T (Eichmüller *et al.*, 2003) e adenocarcinomas esofágiais (Lin *et al.*, 2004; Picard *et al.*, 2007). A expressão dos CTAs é regulada por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e a acetilação/desacetilação de histonas. Picard *et al.* (2007) testaram drogas ou combinações de drogas que poderiam ser usadas para modular a expressão de *MAGEA9*. Foi demonstrado que o tratamento de células com 5-AZA-DC induzia a expressão de *MAGEA9* em linhagens de células que não expressavam este antígeno. No presente estudo, foi demonstrada a diminuição dos níveis desse transcrito, em contraste aos relatados anteriormente. O papel exato que esses transcritos exercem na carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço permanece desconhecido.

Entre os genes com maiores níveis de transcritos está o *FGF7/KGF* (fator de crescimento de queratinócitos). A família dos FGFs (fatores de crescimento fibroblástico) consiste em 18 ligantes que se ligam à quatro receptores homólogos de alta afinidade, os FGFRs (receptores de FGF) (Johnson e Williams, 1993; Beenken e Mohammadi, 2009; Turner e Grose, 2010; Wesche *et al.*, 2011). As vias de sinalização dos FGFs estão implicadas em uma infinidade de processos biológicos. Eles estimulam a proliferação, agem como sinais anti-apoptóticos e estimulam a migração celular em diversos tipos celulares (Beenken e Mohammadi, 2009; Wesche *et al.*, 2011). Os sinais de proliferação são transmitidos principalmente pela sinalização da cascata de MAPK e os sinais anti-apoptóticos, por meio da via PI3K/AKT. No entanto, há considerável associação entre as vias de sinalização, por exemplo, durante a migração celular induzida por FGF, tanto MAPK quanto PI3K parecem ser necessários (Wesche *et al.*, 2011).

Os FGFs são cruciais durante o desenvolvimento, onde eles tem se mostrado moléculas-chave na organogênese (Powers *et al.*, 2000; Turner e Grose, 2010;

Wesche *et al.*, 2011). A sinalização de FGF está envolvida no desenvolvimento do coração, pulmões, membros e sistema nervoso, e também desempenha um papel importante no desenvolvimento da glândula mamária e próstata. Durante o desenvolvimento inicial, a indução do mesoderma é orquestrada pela comunicação epitélio-mesênquima dependente de FGF. Além disso, a sinalização de FGF é importante para a formação de novos vasos sanguíneos, o processo de angiogênese, influenciando outras moléculas sinalizadoras importantes, tais como HGF (fator de crescimento hepatocitário) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Presta *et al.*, 2005). Essas moléculas, juntas, participam de processos de carcinogênese, incluindo a expansão clonal de células tumorais, transição epitélio mesênquima (EMT) e angiogênese (Wesche *et al.*, 2011).

O aumento da expressão de *FGF7*, assim como o demonstrado no presente estudo, já foi relatado em tumores de próstata e bexiga (Gomez-Roman *et al.*, 2005; Mhawech-Fauceglia *et al.*, 2007; Wesche *et al.*, 2011). Mais recentemente, Lin *et al.* (2011) relataram que os fibroblastos associados a carcinomas (CAFs) podem promover a proliferação de células dos carcinomas orais pela secreção abundante de *FGF7*. Esses achados estabeleceram uma base para utilização de CAFs ou *FGF7* na pesquisa como um novo alvo terapêutico anti-tumoral, indicando o importante papel desse gene no desenvolvimento do microambiente tumoral e a progressão do câncer (Lin *et al.*, 2011; Wesche *et al.*, 2011).

Além dos altos níveis de expressão gênica de *FGF7*, outro gene com aumento de expressão foi *ONECUT2* (*OC-2*). O aumento da expressão desse gene foi relatado em células do cérebro, testículo, fígado e pele. Mais recentemente, Furuno *et al.* (2008) identificaram a expressão desse transcrito no timo e no fígado. A família *Onecut* (*OC*) é composta por três membros, *Onecut1* (*OC-1*, originalmente *HNF-6*), *Onecut 2* (*OC-2*), e *Onecut 3* (*OC-3*). Dusing *et al.* (2010) mostraram que camundongos *OC-2* “knockout” não conseguem prosperar após o nascimento, são significativamente menores que os irmãos normais, e tem a mortalidade aumentada no período pós-natal de desenvolvimento. Estudos iniciais em *microarrays* com duodeno mostraram mudanças dramáticas na expressão dos genes intestinais em camundongos *OC-2* “knockout” durante este período pós-natal, especialmente nos genes associados com o epitélio, indicando que o gene *OC-2* pode influenciar positiva ou negativamente a expressão gênica, uma vez que a remoção de *OC-2* causa a

diminuição ou o aumento de genes específicos. Isto incluiu genes relacionados ao transporte e metabolismo, como lipases, apolipoproteínas, aquaporinas, cassete de ligação de ATP, mucinas, colecistoquininas, entre outros (Dusing *et al.*, 2010). A expressão desse gene é essencial no processo de desenvolvimento, porém, não há estudos que o associam à tumorigênese. O aumento da expressão de *OC-2* no contexto cancerígeno pode acarretar na reativação de genes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário, levando ao crescimento e à desdiferenciação celular. Não há relatos de drogas que visam a regulação dos níveis moleculares de *OC-2*, mas possíveis alvos terapêuticos devem ser avaliados com a finalidade de regular negativamente a expressão desse transcrito, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre o impacto desse gene em carcinomas humanos.

Genes com *fold change* >1,5 e <-1,5 foram utilizados na análise de redes, vias canônicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular com a utilização do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, *Ingenuity Systems*, Biodiscovery). Como esperado, entre as principais doenças relacionadas aos genes com alteração no nível de expressão gênica destacam-se o câncer, doença inflamatória e doenças genéticas. Além disso, as principais funções moleculares e celulares identificadas foram migração, desenvolvimento e morfologia celular, além de crescimento e proliferação celular.

Em geral, o câncer surge por meio do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes que atuam nas vias de sinalização associadas ao câncer, caracterizando um fenótipo tumoral, como descrito por Hanahan e Weinberg (2000; 2011). Nesse clássico estudo dos marcadores tumorais, foram determinados seis mecanismos fundamentais das células cancerígenas, entre eles o potencial replicativo ilimitado, a auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade à sinais anti-crescimento, capacidade de evadir aos sinais apoptóticos, invasão e metástase, e angiogênese. Na recente atualização deste estudo, foram incluídos evasão da resposta imune, promoção de inflamação tumoral, instabilidade genômica e mutação e, por fim, desregulação energética celular (Hanahan e Weinberg, 2011). Essas características foram agrupadas e visualizadas por meio de redes biológicas, sendo as quatro principais delas: (1) doença imunológica; (2) câncer, doença genética e ciclo celular; (3) morte celular, expressão gênica e mecanismo de infecção; e (4) morfologia, crescimento e proliferação celular. Essas redes apresentam mais de 29

moléculas alteradas e com alto poder de associação (representado pelo *score* superior a 34).

A análise das redes biológicas revelou o envolvimento de quatro principais redes: rede 1: *VEGFA* (11 interações), *JUN* (10 interações) e *MMP9* (8 interações); rede 2: *CDKN2A* (13 interações), *Histona h3* (12 interações), *CDH1* (8 interações); rede 3: *AR* (12 interações), *IL2* (10 interações), *ATXN1* (8 interações); e rede 4: *CDKN1A* (11 interações), *AGT* (10 interações), *VEGF* (8 interações) e *FN1* (8 interações), todos com aumento de expressão. Vários desses genes já foram relatados como alterados em carcinomas de orofaringe, entre eles *CDKN2A* (Martinez *et al.*, 2007), *MMP* (Chung *et al.*, 2006), *VEGF* e *CDKN1A* (Irié *et al.*, 2004).

Dentre os genes alterados, aqueles que apresentaram maior número de interações merecem maior destaque, sendo eles reguladores ou regulados por um elevado número de moléculas, as quais desencadeariam alterações moleculares fundamentais no desenvolvimento tumoral. Nesta categoria encontra-se o gene *CDKN2A* (13 interações), o qual é frequentemente associado à tumores HPV positivos, assim como outro membro da família de inibidores de CDK, o *CDKN1A*, (11 interações), ambos com aumento de expressão gênica. Esses genes funcionam como reguladores do ciclo celular na passagem entre as fases G1 e S e seus altos níveis levam a parada do ciclo celular (Eymín e Gazzeri *et al.*, 2010).

A proteína *CDKN1A* foi reportada como alvo de clivagem pela caspase 3-like, a qual levaria a uma ativação dramática de *CDK2*, e pode ser o essencial na execução da apoptose mediada pela ativação da caspase. Esse poderia ser um importante mecanismo de regulação negativo do aumento de expressão desse gene e alvo para terapias gene-específicas (Bao *et al.*, 2006).

Outro gene frequentemente alterado e com grande número de interações é o *VEGFA/VEGF*, família do fator de crescimento endotelial vascular, que apresentou aumento de expressão gênica. A expressão de *VEGF* pode ser induzida ou aumentada por fatores epigenéticos, por perda ou inativação de supressores de tumor ou pela ativação de oncogenes, como *EGFR* (Kerbel, 2008). Por outro lado, *VEGF* tem sido demonstrado como regulador positivo de *EGFR* em células de carcinoma de colo uterino (del Campo *et al.*, 2008; Fei *et al.*, 2009). Tem sido sugerido que as drogas alvo específicas para *EGFR* podem exercer seus efeitos, em parte, pela redução da

secreção de fatores pró-angiogênicos, incluindo VEGF (Bozec *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2009).

Estudos prévios demonstraram que pacientes tratados por radioterapia cujos tumores possuíam marcação imunoistoquímica forte para VEGF tinham pior prognóstico e maior chance de morrer. Esta relação permaneceu após a associação com o HPV e estágio TMN (Martin *et al.*, 2007). Onesto *et al.* (2006), juntamente com dados prévios da literatura, sugerem que o *status* de VEGF pode ser um fator importante no estabelecimento de prognóstico e seleção de modalidades de tratamento para CECP. Terapias anti-angiogênicas direcionadas podem ter impacto positivo no tratamento de CECP. No presente estudo, o aumento de expressão de *VEGFA* foi verificado em 67% dos casos HPV positivos; 75% deles apresentaram resposta completa ao tratamento químico e radioterápico. Assim, aparentemente a infecção pelo HPV e os eventos moleculares a esse evento são fatores prognósticos mais forte do que a expressão isolada de *VEGFA*. Fei *et al.* (2009) concluíram que o HPV é um marcador prognóstico melhor se comparado à VEGF ou EGFR em CE de tonsila palatina.

Associado à rede biológica que compreende *VEGFA*, outro gene com aumento de expressão gênica foi *JUN*. *c-JUN* é um proto-oncogene e a ativação de c-Jun N-terminal quinase (JNK) e a fosforilação de c-Jun são necessárias para a transformação maligna induzida por *Ras*, um oncogene que é mutacionalmente ativado em ~30% dos tumores humanos (Adjei, 2001) e que frequentemente é observado com aumento de expressão em CECP (McDonald *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 2007).

Gross *et al.* (2007) mostraram que o tratamento com SP600125 (inibidor não seletivo de JNKs, competitivo com ATP) ou siRNA para JNK1/2 levou a uma redução significativa na produção de VEGF. Este achado é consistente com evidências anteriores de que JNKs podem regular a produção de VEGF em fibroblastos humanos orais (Naruishi *et al.*, 2003). Como VEGF também pode estimular a atividade de JNK (Pedram *et al.*, 1998), é possível que um inibidor de JNK possa interromper o ciclo de retroalimentação positiva importante para o crescimento do tumor. Além de suprimir a produção de VEGF, a inibição da JNKs resulta na diminuição da produção de IL-8, uma quimiocina envolvida tanto no desenvolvimento dos CECP quanto na angiogênese (Li *et al.*, 2003; Charalambous *et al.*, 2005; Kainuma *et al.*, 2006; Gross

et al., 2007). A atividade de JNK é importante para a proliferação celular e progressão do ciclo celular (Du *et al.*, 2004). A inibição JNK resulta em um aumento da porcentagem de células nas fases S e G2-M do ciclo celular. Células tumorais em G2-M são altamente sensíveis à radiação (Bernhard *et al.*, 1999). Tanto a cisplatina quanto a radiação, que são comumente usadas combinadas no tratamento de CECP, podem matar as células tumorais mais eficazmente na fase S (Schwartz e Shah, 2005; Ambrosini *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2007). Com base nos dados publicados anteriormente, se faz necessário determinar se a inibição da JNKs antes da quimioirradiação adjuvante aumenta a morte celular nos CECPs, podendo ser esse um mecanismo de tratamento alvo específico eficaz para potencializar os efeitos do tratamento neoadjuvante nesses tumores.

Ainda na rede gênica com a presença de *VEGFA* e *JUN*, foi verificado o aumento na expressão do gene *MMP9*. Metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases que podem degradar coletivamente todos os principais componentes da matriz extracelular (Brinckerhoff *et al.*, 2002). Os principais inibidores da atividade de MMP são os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), um grupo de quatro proteínas secretadas que se ligam reversivelmente e inativam MMPs de forma estequiométrica 1:1 (Baker *et al.*, 2002). TIMPs diferem em seus padrões de expressão e atividades inibitórias para certas MMPs (Baker *et al.*, 2002; Stokes *et al.*, 2010). Vários estudos tem explorado o envolvimento das proteinases no desenvolvimento de CECP e a maioria das proteinases estudadas e associadas aos CECPs apresentam aumento de expressão nos tumores e metástases. É consenso que as MMP2, 7, 9, 10, 13 e TIMP1 são particularmente envolvidas na patogênese e progressão dos CECPs (Thomas *et al.*, 1999; Wernwe *et al.*, 2002; Rosenthal e Matrisian, 2006; Stokes *et al.*, 2010).

Recentemente, Lee *et al.* (2011) relataram a expressão de MMP9 em células tumorais isoladas, o que sugere que a MMP9 é produzida pelas próprias células do tumor. No entanto, não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a expressão de MMP9 e estádios tumorais mais avançados. Os autores mostraram em análise multivariada que a expressão MMP9 estava associada a um pior prognóstico, o que sugere seu papel importante na progressão do tumor. Os resultados do presente estudo são concordantes com os dados da literatura, no qual o aumento da expressão de *MMP9* foi verificado em 20 dos 22 casos de CEO analisados para expressão gênica.

Confirmando a associação de seu aumento de expressão e estágio clínicos avançados, um dos dois casos que apresentaram níveis normais de expressão de *MMP9* possui estágio T-2.

No presente estudo foi realizada a análise supervisionada dos dados obtidos da análise de expressão gênica dos CEO segundo a presença (9 casos) ou ausência de HPV (13 casos). Foram classificados 104 genes com expressão diferencial entre os dois grupos, dos quais 54 apresentavam funções conhecidas. A comparação destes achados com os descritos em carcinomas de orofaringe, segundo o padrão de infecção pelo HPV foi descrito em detalhes acima. Os genes diferencialmente expressos foram utilizados para análise de redes e vias canônicas e classificados quanto às principais doenças, funções moleculares e celulares de acordo com a presença ou ausência de HPV.

Foi observado um grande número de moléculas alteradas envolvidas no mecanismo de duplicação, recombinação e reparo do DNA e câncer, sendo o transporte molecular e o tráfego protéico as funções moleculares e celulares predominantes dessas moléculas. Lohavanichbutr *et al.* (2009) também utilizaram análises das principais funções dos genes diferencialmente expressos em tumores HPV positivos e negativos usando o *Ingenuity Pathway Analysis*. Semelhante aos nossos achados, as principais funções estavam relacionadas a replicação do DNA, recombinação, reparo do DNA e ciclo celular. Como o HPV não codifica DNA ou RNA polimerase, ele depende da célula hospedeira para as funções de controle do ciclo celular e de replicação do DNA.

No presente estudo, os genes com maiores *scores de fold change* e que mostraram associação com processos tumorais entre os casos HPV positivos e negativos foram *PARK7* (1,47), *LARP7* (1,56), *VIM* (3,12), *KRAS* (-1,63).

A comparação dos dados aqui obtidos com os principais estudos que associaram o padrão de infecção por HPV em tumores de cabeça e pescoço (Slebos *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2007; Lohavanichbutr *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010), não revelaram dados concordantes. Essa diferença entre os resultados pode ser dada devido às características da casuística avaliada (no presente estudo só foram avaliadas amostras de CE de orofaringe), às plataformas de expressão gênica global utilizadas (na ocasião, 4x44K, *Agilent Technologies*), assim como a análise estatística

dos dados (SAM e teste-t) e a limitação do número de amostras do presente estudo (apenas 22 casos com RNA disponível, sendo nove HPV positivos e 13, negativos).

Entretanto, muitos genes diferencialmente expressos no presente estudo já foram relatados em tumores de cabeça e pescoço e são frequentemente associados a carcinogênese e a progressão tumoral, entre eles a vimentina (VIM), um marcador de células mesenquimais, associada a componentes do citoesqueleto e adesão a membranas. Estudos de carcinomas epiteliais humanos, como de mama, hepatocelular, de cólon e próstata, tem mostrado que a expressão da vimentina pode ser correlacionada com a invasão tumoral e um pior prognóstico (Steinert e Roop, 1988; Ramaekers *et al.*, 1983; Gilles *et al.*, 1996; Gilles *et al.*, 1999; Gilles *et al.*, 2003; Thiery, 2003; Huber *et al.*, 2005; Christiansen e Rajasekaran, 2006; Mandal *et al.*, 2008; Paccione *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Relatos em literatura detectaram a expressão da vimentina em pacientes e linhagens celulares de CE orais (de Araujo *et al.*, 1993; Islam *et al.*, 2000; Mandal *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2010), demonstraram que a expressão aumentada da vimentina em CE orais estavam intimamente associados à recidiva local. Usando análise univariada ou multivariada, a expressão aumentada de vimentina mostrou uma associação significativa com menor sobrevida global ou livre de doença em pacientes com CE oral. Em pacientes com CE oral, os tumores com baixa ou ausência de expressão de vimentina foram correlacionados com um melhor prognóstico comparados aos tumores com alta expressão de vimentina. Além disso, a forte expressão da vimentina foi encontrada nas células tumorais invasoras no frente de invasão. Com estes achados, Liu *et al.* (2010) sugerem que a vimentina pode fornecer informações prognósticas em carcinomas epidermóides orais. Os dados em literatura não mostram o padrão de infecção pelo HPV nos casos avaliados para expressão da VIM e, além disso, a maioria dos estudos se refere à expressão protéica, e não gênica. Os dados deste estudo mostram um padrão de expressão aumentado de VIM entre os casos HPV positivos quando comparados com os negativos, contradizendo os relatos na literatura sobre o papel desse gene quanto ao prognóstico desfavorável e ao papel da infecção associado a bom prognóstico. Assim, a alteração dos níveis gênicos da VIM pode não ser, isoladamente, um marcador de prognóstico desfavorável nos casos HPV positivos.

A via de sinalização de junção celular apresentou o maior *score* na análise de vias canônicas, seguido das vias de regulação de ciclinas e ciclo celular, sinalização

ceramida e sinalização da leucemia mielóide crônica. Dentre essas vias, os genes que se apresentaram na maioria delas foi o *KRAS* e *PPP2R5A* (diminuição de expressão) e *TGFB3* e *TNFRSF11B* (aumento de expressão) no grupo HPV positivo comparado ao HPV negativo.

Os 54 genes diferencialmente expressos entre tumores HPV positivos e negativos aqui detectados não foram associados aos relatos prévios em literatura. No entanto, os genes alterados participam de vias de sinalização frequentemente associados ao desenvolvimento tumoral, entre elas a via *TGF beta*, na qual é verificada a diminuição de expressão de seus receptores e consequente aumento de expressão dos fatores de crescimento tumoral (Wang *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 2004; Leemans, *et al.*, 2011). Entre os genes integrantes das redes e com função conhecida, destacam-se *CRKL*(↓) e *ACOX1*(↓) (rede 1), *TCF12* e *MDH2*(↓) (rede 2), o complexo *TGF beta*, *TNFRSF11B* e *VIM* (rede 3) e *RYBP* e *PHF1* (rede 4). Os genes assinalados com o símbolo (↓) se apresentaram com diminuição de expressão e os demais, com aumento.

O TGF-beta é conhecido por seus efeitos antiproliferativos e a evasão desses efeitos pela células tumorais é um evento muito mais elaborado do que a simples interrupção de sua sinalização (Bierie e Moses, 2006; Massagué, 2008; Ikushima e Miyazono, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011). Em muitos tumores em estágio avançado, a sinalização de TGF-beta é redirecionada para a supressão da proliferação celular, é responsável pela ativação da transição epitélio mesênquima (EMT), conferindo alto grau de malignidade nas células tumorais. Portanto, TGF-beta pode atuar como supressor tumoral em estágios iniciais da tumorigênese e promotor da carcinogênese em estágios mais avançados (Hanahan e Weinberg, 2011). No presente estudo foi detectado aumento da expressão gênica de *TGFB3*; 95% dos casos com essa alteração apresentavam estágio clínico 3 e 4, dando evidências adicionais do envolvimento deste gene na progressão tumoral.

Em conclusão, os achados da análise da expressão gênica em larga escala confirmaram o envolvimento de genes diferencialmente expressos já relatados em literatura como associados ao padrão de infecção pelo HPV. Outros genes foram descritos dando novos alvos moleculares em tumores associados a infecção pelo HPV.

3. Integração dos dados genômicos e transcriptômicos

As análises utilizando abordagens em larga escala para investigações genômicas e transcriptômicas tem promovido o avanço do conhecimento na área do câncer. Embora unidimensionais, essas análises permitem a descoberta de genes novos associados à doenças assim como marcadores moleculares de prognósticos e alvos terapêuticos. Recentemente ,vários estudos tem utilizado análises combinadas dos resultados genômicos, transcriptômicos e epigenômicos. Neste estudo, foi utilizada a análise integrada dos dados de alterações no número de cópias e expressão gênica global. Esta análise possibilita a identificação de genes que frequentemente estão alterados por múltiplos mecanismos mas em baixa frequência por qualquer um deles e vias que estão frequentemente alteradas por múltiplos componentes mas em baixa frequência em componentes individuais. Estes benefícios em utilizar a análise integrada ilustra o conceito de que o todo é maior que a soma das partes (Chari *et al.*, 2010). Devido ao aumento no interesse em estudar a correlação entre dois ou mais dados gerados em larga escala, é realizada a análise integrada com o intuito de proporcionar uma visão global e unificada dos dados (Hawkins *et al.*, 2010; Sonesson *et al.*, 2010).

O método GISTIC utiliza a frequência e a magnitude das alterações do número de cópias de DNA para identificar marcadores potenciais sem a definição de limiares fixados, como a maioria dos estudos utiliza. Este método tem sido recentemente aplicado a uma variedade de estudos em larga escala (Smith *et al.*, 2009; Jönsson *et al.*, 2010; Rantala *et al.*, 2010; Tsui e Garnis, 2010; Xu *et al.*, 2010; Zavadil *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2011; Goh *et al.*, 2011; Rose *et al.*, 2011). Em adição, o software CONEXIC foi utilizado para integrar os dados genômicos e transcriptômicos. Este método é baseado em uma pesquisa guiada por escores para identificar a combinação de moduladores que melhor expliquem o comportamento de um modulo de expressão gênica nas amostras tumorais e pesquisa aqueles com maiores escores em uma região envolvida em ganhos e perdas genômicas. A lista de genes então produzida ranqueia os moduladores com altos escores com correlação nos módulos de expressão nas diferentes amostras e que estejam mapeados em regiões envolvidas em ganhos ou perdas em um número significante de amostras. O fato dos moduladores estarem envolvidos em ganhos ou perdas genômicas indica que

eles, provavelmente, regulam a expressão dos genes correspondentes nos módulos (Akavia *et al.*, 2010).

Por essa estratégia foram identificados 22 genes moduladores resultantes da análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos nos 22 CE de orofaringe analisados. Entre os genes moduladores, 16 deles apresentaram concordância direta entre ganhos genômicos e aumento de expressão dos transcritos, os outros seis mostraram ganhos genômicos e diminuição da expressão do transcrito. Interessantemente, todos os genes alterados estavam envolvidos em ganhos genômicos e a maioria deles em aumento do transcrito. A amplificação gênica tem um importante papel no câncer sendo um dos mecanismos conhecidos de ativação de oncogenes. É também estabelecido que a amplificação está associada a resistência a tratamento quimioterápico pelo aumento do número de cópias de genes codificadores de alvos de drogas (Goker *et al.*, 1995; Gorlick *et al.*, 1996; Gorre *et al.*, 2001). Além disso, a presença da amplificação gênica pode ter valor prognóstico e diagnóstico e pode ajudar na orientação terapêutica em tipos específicos de tumores (Mondello *et al.*, 2010).

Para o nosso conhecimento, há poucos relatos em literatura utilizando análise integrada em amostras de carcinomas de cabeça e pescoço (Smith *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Tsui e Garnis, 2010) e nenhum deles em carcinomas de orofaringe. A maioria dos estudos abordam isoladamente o perfil genômico ou transcriptômico. Entre eles, Akervall *et al.* (2004) avaliaram o perfil genômico e de expressão de CE de cabeça e pescoço separadamente tanto em linhagens de células sensíveis quanto resistentes à cisplatina por cariótipo espectral (SKY), CGH cromossômico e *cDNA microarray*. Foram encontradas aberrações mais complexas nas linhagens de células resistentes comparadas às células sensíveis, sendo que quase todos os cromossomos apresentaram alterações no número de cópias genômicas, envolvendo diversos *loci* gênicos nas linhagens resistentes (principalmente perdas em 4p e 18q e ganhos em 3q, 7p, 11q e 20q). Na análise supervisionada, foram identificados aproximadamente 60 genes que diferenciaram as linhagens resistentes das sensíveis. Alguns destes genes estão associados com proliferação, metástase e resistência à droga, como *TIMP-2*, *CAVEOLIN-2*, *PRAME* e *DAP*. Além disso, os autores enfatizaram o oncogene *MET*, importante em uma variedade de funções celulares, como proliferação, mitogênese, angiogênese e metástase.

O oncogene *MET* foi observado com ganhos em cinco casos, sendo que dois deles (O-02 e 1025726) apresentaram resposta parcial ao tratamento com cisplatina, confirmando um possível papel de resistência ao quimioterápico utilizado. Estudos de análise do transcrito e da proteína em um maior de número de casos podem confirmar o envolvimento deste oncogene na resposta ao tratamento de carcinomas de orofaringe.

Recentemente, alguns grupos referem o uso de análise integrada de dados por diferentes métodos em carcinomas de cabeça e pescoço. Smith *et al.* (2009) realizaram a análise integrada baseando-se em relatos anteriores de alterações genômicas em CE de cabeça e pescoço (*Human Genome reference sequence and the annotation database*) e os dados de expressão gênica global (*Affymetrix GeneChip U133A e U133B*) de suas amostras para determinar potenciais oncogenes ativados por amplificação ou genes supressores tumorais inativados por deleção. Dentre os 20 genes localizados em regiões de perdas e ganhos cromossômicos que tiveram expressão diferencial em CE de cabeça e pescoço, os genes *RUNX1T1*, *RFC4* e *DLEC1* foram detectados. Dentre os 12 casos de CE de cabeça e pescoço estudados, seis (50%) apresentaram amplificação e 4/6 (67%) aumento de expressão de *RUNX1T1*; cinco (42%) tinham amplificação e 1/5 aumento de expressão do gene *RFC4*; quatro (33%) apresentaram deleção e 3/4 diminuição de expressão do transcrito *DLEC*.

No presente estudo, esses genes não foram significativamente alterados na análise integrada dos dados. Essa discrepância pode ser dada por diversos motivos, entre eles uma limitação metodológica das duas técnicas utilizadas, às ferramentas de bioinformática aplicadas nesses dados para integração dos mesmos, ou pelo fato desses genes não estarem associados aos tumores epidermóides de orofaringe.

Xu *et al.* (2010) estudaram genes associados a sobrevida após a análise integrada das alterações no número de cópias (*Affymetrix Human Mapping 250 K Nsp I*) e expressão gênica global (*Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 array*) em linfonodos metastáticos oriundos de CEs orais. A região genômica 11q13.2-11q13.3 contendo um agrupamento de 12 genes mostrou a correlação mais alta entre CNAs e expressão gênica. Sete dos 12 genes (*CPT1A*, *MRPL21*, *TPCN2*, *ORAOV1*, *FADD*, *PPFIA1* e um transcrito não conhecido) apresentaram alta correlação entre número de cópias e expressão e cinco genes (*IGHMBP2*, *MRGPRF*, *MYEOV*, *CCND1* e *ANO1*)

da mesma região não mostraram correlação significativa entre o número de cópias e expressão dos transcritos. Além disso, 27 transcritos representados por 24 genes foram relacionados à sobrevivência, onde a maioria estava associada à morte celular (*CCT6A*, *FADD*, *NFE2L2*, *RAD23B*, *STEAP3* e *TREM1*) e migração celular (*FADD*, *NFE2L2* e *PPFIA1*).

Na análise comparativa destes dados com os do presente estudo, o único gene que foi observado entre os moduladores é o *MRGPRF*, mapeado em 11q13.3. Entretanto, além do *MRGPRF*, outros três genes também mapeados em 11q13-q13.3 estavam alterados na análise integrada do presente estudo: *CHKA*, *GSTP1* e *SSH3*, todos com aumento do número de cópias. Destes, apenas o *CHKA* não apresentou correlação direta, tendo sido observado ganho genômico e diminuição da expressão do transcrito.

Não temos conhecimento de relatos da associação dos genes *MRGPRF* e *SSH3* com o desenvolvimento e a progressão tumoral, porém, *GSTP1* (glutathione S-transferase P1) desempenha vários papéis essenciais em células normais e neoplásicas, incluindo metabolismo de xenobióticos, resposta ao estresse, sinalização e apoptose. O aumento da expressão de *GSTP1* tem sido observado em diversos subtipos tumorais, entre eles os CECPs. Mutallip *et al.* (2011) investigaram o papel de *GSTP1* em duas linhagens de células de CECP, HSC3 e SAS. O silenciamento de *GSTP1* revelou uma significativa diminuição da proliferação de células cancerosas em ambas as linhagens avaliadas. Os dados indicaram que *GSTP1* pode ter uma função oncogênica e pode ser regulado por miRNAs ou hipermetilação (Karius *et al.*, 2011). Esse pode ser um importante marcador tumoral para carcinomas de orofaringe e seu papel de oncogene pode ser fundamental no mecanismo da carcinogênese.

A análise integrada das alterações genômicas e de expressão de transcritos foi realizada em linhagens celulares de cabeça e pescoço por Tsui e Garnis (2010). Nas seis linhagens celulares estudadas (SCC-4, SCC-9, SCC-25, SCC-15, CAL27 - base de língua e A253 - glândula salivar) foram relatadas perdas em 3p e 9p. A linhagem CAL27 apresentou perda em 9p24.1-p23, enquanto as outras cinco linhagens celulares exibiram perda em 9p21.3, que contém o supressor tumoral *CDKN2A*. A perda de todo o braço curto do cromossomo 8 foi encontrada nas linhagens SCC-15, SCC-9, CAL27, enquanto A253 exibiu uma região de deleção homozigota no 8p23.2-

p23.2 e outra região de alto nível de amplificação em 8p22. As linhagens A253, SCC-15, SCC-4, SCC-25 e SCC-9 mostraram baixo nível de ganho em 8q24 (*MYC*). As linhagens A253, SCC-15 e SCC-25 mostraram ganhos de baixo nível também em 3q26.32. As linhagens SCC-15 e CAL27 exibiram a região de amplificação de alto nível do *EGFR*, enquanto SCC-4, SCC-9 e A253 exibiram ganho de baixo nível nesse locus. As linhagens SCC-9 e CAL27 demonstraram ganho de *CCND1*, enquanto A253, SCC-15, SCC-4 e SCC-25 demonstraram alto nível de amplificação neste locus. Alterações complexas no braço longo do cromossomo 11 foram observadas em SCC-15, SCC-4, SCC-25 e A253. No geral, as regiões de deleções homozigotas resultaram em baixos níveis de expressão dos genes mapeados nesta região, enquanto um alto nível de expressão foi observado em pelo menos 1 gene dentro deste *amplicon* comparado às linhagens celulares sem tal *amplicon*.

Entre os 22 genes moduladores detectados neste estudo, vinte deles também foram descritos por Slebos *et al.* (2006) e Pyeon *et al.* (2007) (análise realizada com os dados depositados no banco de dados GEO, Genomic Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Os dois estudos realizaram a comparação entre tumores HPV positivos e negativos de CP (incluindo orofaringe), e Pyeon *et al.* (2007) também realizaram a comparação entre carcinomas cervicais. Dos vinte genes em comum, oito deles apresentaram o mesmo padrão de alteração gênica, sendo relatado com aumento de expressão gênica nos três estudos (*PLEKHN1*, *TNFRSF18*, *TNFRSF4*, *MIB2*, *MMP23B*, *AHNAK2*, *METRNL*, *TBX1*, *CSF2RA*).

É interessante notar que entre os 22 genes moduladores aqui detectados, sete são mapeados em 1q36-1q36.33 (*SAMD11*, *PLEKHN1*, *MIB2*, *TNFRSF18*, *MMP23B*, *TNFRSF4* e *PRKCZ*; seis deles tem correlação direta, exceto *SAMD11*); um está mapeado em 8p11.2 (*WHSC1L1*); quatro estão mapeados em 11q13-q13.3 (*CHKA*, *GSTP1*, *SSH3*, *MRGPRF*); dois estão mapeados em 14q31.33 (*KIAA0284* e *AHNAK2*); um em 17q25.3 (*METRNL*); quatro em 22q11.21 (*SERPIND1*, *MGC16703*, *DGCR2* e *TBX1*; os dois primeiros tem correlação inversa); um mapeia-se em Xp22.32 (*CSF2RA*) e dois em Xq28 (*MAGEA6* e *MAGEA2B*; os dois com correlação inversa). Esse achado demonstra a complexidade detectada entre as alterações no número de cópias de DNA e a expressão de genes individuais. Em uma mesma região encontram-se genes que mostram correlação direta enquanto outros apresentam correlação inversa (aumento do número de cópias e diminuição do transcrito). Uma

possível explicação para esse achado é o envolvimento de miRNAs reguladores desses genes.

Entre os seis genes que apresentaram padrão inverso de correlação entre as análises de CGH-*array* e expressão gênica global, os genes *SAMD11* e *CHKA* são regulados por miRNAs já descritos em bancos de dados. O gene *SAMD11* é regulado pelo microRNA miR-504 (mapeado em Xq26.3, segundo o banco de dados *TargetScan* - http://www.targetscan.org/vert_50/). Essa região foi encontrada com ganhos genômicos em mais de 21% dos casos de CEC de orofaringe. O miR-504 foi identificado como um miRNA regulador da expressão de p53 pela sua ligação aos sítios 3'UTR do gene *TP53*. O aumento da expressão desse miRNA reduz os níveis protéicos de p53 e prejudica suas funções, assim como a ativação da transcrição dos genes mediados por p53, apoptose e parada do ciclo celular. Além disso, o miR-504 promove a tumorigênese de células “in vivo”. A regulação do p53 por esse miRNA atua como um mecanismo das células para regular as atividades e funções de p53 (Hu *et al.*, 2010).

O outro gene de correlação inversa *CHKA* é regulado pelos mi-RNAs da família miR-30 (*TargetScan* - http://www.targetscan.org/vert_50/ e miRDIP - <http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>). A colina quinase (CHK) é uma enzima metabólica que, apesar de sua função estrutural, sua isoforma alfa (CHKA) é intimamente relacionada à regulação do crescimento celular, possuindo um importante papel na transformação celular e no processo de carcinogênese (Nakagami *et al.*, 1999; Lacal, 2001; Ramirez de Molina *et al.*, 2002a; 2002b; Ramirez de Molina *et al.*, 2005). A expressão aumentada deste gene tem sido relatada em muitos cânceres incluindo mama, pulmão, próstata e câncer colorretal, possuindo nestes casos, atividade oncogênica. Além disso, estudos em pacientes em estágio inicial de carcinoma de células não-pequenas de pulmão identificou o aumento desse gene como um fator associados a pacientes com pior prognóstico, os quais poderiam ser submetidos a uma estratégia diferente de tratamento (Ramirez de Molina *et al.*, 2007; Hernando *et al.*, 2009). O aumento de expressão e a atividade aumentada dessa proteína foi demonstrada em células malignas e tumores de pulmão, cólon, mama, próstata e ovários (Ramirez de Molina *et al.*, 2002b; Iorio *et al.*, 2005). A inibição de CHKA foi demonstrada como um importante fator antitumoral,

demonstrando ser essa uma estratégia eficiente de terapia tumoral (Banez-Coronel *et al.*, 2008).

Outro gene que apresentou correlação inversa foi o *SERPIND1* (mapeado em 22q11.21: ganhos genômicos e diminuição do transcrito). Recentemente, o gene *SERPIND1* foi considerado como um novo biomarcador associado a progressão tumoral em carcinomas de células escamosas cutâneas (Farshchian *et al.*, 2011). Os autores relataram um aumento do níveis de expressão deste gene nestas linhagens celulares comparados com queratinócitos normais.

Além dos mecanismos de regulação da expressão de transcritos por miRNAs, um outro mecanismo possível é por metilação. O mecanismo de regulação pós-transcricional por metilação, por exemplo, promove alterações na expressão gênica independente das alterações na sequência de DNA (Sharma *et al.*, 2010). Além da metilação do DNA (metilação nas bases de citosina do DNA, nos dinucleotídeos CG, que agrupados são chamados de ilhas CpG), podem também haver mecanismos de regulação por modificação de histonas (modificações pós-translacionais que alteram a interação com o DNA e as proteínas nucleares, tais como acetilação e metilação) e pelos RNAs pequenos não codificadores já descritos acima. A metilação das ilhas CpGs é associada à supressão da expressão gênica. A maioria dos genes aqui descritos como moduladores são pouco discutidos em literatura, mas o mecanismo de correlação inversa aqui descrito pode também ser explicado por regulação epigenética.

Muitos dos genes moduladores aqui detectados tem relevância mecanística estando associados com ciclo celular, apoptose ou migração celular. A expressão alterada destes genes sugere sua origem por alteração no número de cópias, modificando assim o controle celular normal.

O mapeamento destes genes também demonstra que várias alterações no número de cópias estão localizadas em *clusters* de genes incluindo 1p36, 11q13, 14q32, 22q11.21 e Xq28. É interessante ressaltar que 12 dos 22 genes moduladores se mapeiam em regiões subteloméricas (7 genes no cromossomo 1, 2 genes no cromossomo 14 e os 2 em Xq28) ou pericentroméricas (1 gene mapeado em 8p11.2). Além disso, em dois desses *clusters*, em 1p36 e 11q13, também estão mapeados três miRNAs: o miR-8 (1p36.33-p36.32), miR-548 e mir-612 (ambos localizados em

11q13.1-q13.3), que podem contribuir para a regulação de vários genes alterados quanto aos níveis de expressão. Provavelmente um único evento que leva a formação de CNAs nestas regiões promova a alteração na regulação dos múltiplos genes.

As CNAs tendem a ser agrupados em regiões de arquitetura genômica complexa, caracterizadas por repetições de pequenas cópias (LCRs - do inglês *low copy regions*) diretas e invertidas. Alguns *clusters* poderiam resultar da ausência de genes de dosagem sensíveis em determinadas regiões, mas há ampla evidência de que também estão envolvidas características específicas da arquitetura cromossômica. O efeito mais claro disso é que as alterações mediadas por recombinações homólogas não-alélicas ocorrem onde há LCRs pré-existentes que fornecem a homologia necessária para a recombinação. Influências mais sutis incluem: a ocorrência preferencial de variação no número de cópias em regiões de heterocromatina próxima aos telômeros (Shao *et al.*, 2008; Yatsenko *et al.*, 2009) e centrômeros (She *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006); a associação entre alterações do número de cópias com as estruturas de sequência específica, tais como origens de replicação, finalizadores de replicação (Payen *et al.*, 2008) e SARs (*scaffold attachment region* - DNA rico em AT com sítios para Topo II) (Nobile *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 2005); a ocorrência de alterações não recorrentes nas regiões múltiplas LCRs (Stankiewicz *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007) incluindo repetições invertidas e sequências palindrômicas (revisado por Tanaka *et al.*, 2009); e o papel das sequências repetitivas e longos e curtos elementos nucleares intercalados (LINEs e SINEs, respectivamente) na geração de alterações estruturais (de Smith *et al.*, 2008; Hastings *et al.*, 2009).

É possível que nessas regiões um único *driver* esteja associado a progressão tumoral, entretanto, não pode ser excluída a possibilidade de que diversos genes mapeados na região contribuam igualmente para o processo tumoral. Resultados semelhantes ao aqui descritos também foram reportados por Xu *et al.* (2010). Entretanto, a presença de algumas alterações genômicas mapeadas em regiões de grande instabilidade, como as periteloméricas e pericentroméricas (envolvendo 14 dos 22 genes moduladores), podem sugerir que essas promovam alterações na expressão apenas por efeitos de dosagem gênica e não tenham relevância prognóstica. Certamente, o número amostral é pequeno e estudos integrados em larga escala e funcionais são essenciais para validar o presente achado.

Também foi realizada uma análise comparativa entre o padrão de infecção pelo HPV e a presença destas alterações. Foi observado que 20 dos 22 genes moduladores apresentavam-se alterados tanto nos casos HPV positivos como negativos. O gene *SSH3* (11q13.2) apresentava-se com aumento de expressão exclusivamente nos casos HPV negativos (54% dos casos), assim como o gene *DGCR2* (aumento de expressão em 46% dos casos HPV negativos).

O gene *SSH3* pertence à família de fosfatase *slingshot*, que é conhecido por regular a atividade da cofilina (regulação da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina) e, conseqüentemente regula o padrão de fosforilação dos queratinócitos humanos (Kligys *et al.*, 2007). O outro gene alterado exclusivamente nos tumores HPV negativos foi *DGCR2*, o qual codifica um provável receptor de adesão o qual foi associado à patogênese da esquizofrenia (Shifman *et al.*, 2006). Porém, não há relatos da associação desses genes com o desenvolvimento e a progressão tumoral.

Na comparação com a resposta ao tratamento com carboplatina foi observado que todos os casos com resposta completa apresentaram expressão diminuída do transcrito *SAMD11* comparados com 50% dos casos RP+DP. Esse gene mostrou correlação inversa (ganhos e diminuição da expressão do transcrito). O gene *GSTP1* mostrou também diferença entre os dois grupos: 41% dos casos RC *versus* 83% dos casos RP+DP. O gene *TBX1* mostrou expressão aumentada em 50% dos casos com RC *versus* 100% dos casos com RP+DP. Apesar da ausência de estudos entre a expressão desse fator de transcrição e os processos de carcinogênese dos CECP, assim como resposta à quimioterápicos, esse pode ser um importante marcador de resposta a tratamento, que precisa ser melhor estudado. As três principais funções moleculares e celulares associadas a estes genes incluem: morte celular, sinalização e interação célula a célula e resposta inflamatória. Essas funções são constantemente associadas ao desenvolvimento tumoral.

As três principais vias canônicas alteradas neste estudo foram a resposta ao estresse oxidativo por NRF2 (*GSTP1* e *PRCKZ*), sinalização de extravasamento de leucócitos (*MMP23B* e *PRCKZ*), e produção de IL15 (*PRCKZ*). Segundo o relatório do próprio programa *Canonical Pathways Report* (IPA), o estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a produção de oxigênio reativo e a desintoxicação dos

intermediários reativos. Intermediários reativos, tais como peróxidos e radicais livres, podem ser muito prejudiciais aos componentes celulares, como proteínas, lipídios e o próprio DNA. O estresse oxidativo grave pode desencadear a apoptose e a necrose, e está envolvido em muitas doenças como a aterosclerose, doença de Parkinson e de Alzheimer. A resposta de defesa celular ao estresse oxidativo inclui a indução de enzimas desintoxicantes e enzimas antioxidantes. O fator nuclear-eritróide 2 (Nrf2) liga-se aos elementos de resposta antioxidante (ARE) dentro do promotor destas enzimas e ativa a sua transcrição. Após a exposição das células ao estresse oxidativo, Nrf2 é fosforilada em resposta à proteína quinase C, fosfatidilinositol 3-quinase e as vias da quinase MAP. Depois de fosforilação, Nrf2 transloca para o núcleo, liga-se AREs e transativa enzimas desintoxicantes e antioxidantes, como as GSTs, os citocromos P450, NAD(P)H quinona oxidorreductase, heme oxigenase e superóxido dismutase.

A interleucina 15 (IL-15) exerce importantes efeitos na proliferação, sobrevivência e diferenciação de células NK e células T. A IL-15 é produzida em uma variedade de tipos celulares, como monócitos, células dendríticas, queratinócitos e fibroblastos. Sua produção está sob controle complexo com regulação em nível da transcrição, tradução, tráfico intracelular e translocação (*Canonical Pathways Report* - IPA).

Essas três vias descritas acima podem estar intimamente relacionadas com o desenvolvimento tumoral, e os genes alterados que participam delas, como *GSTP1*, *MMP23B* e *PRCKZ*, podem ser importantes para o entendimento da interação tumoral com o meio extracelular.

O papel que o sistema imunológico desempenha em resistir ou erradicar a formação e progressão de neoplasias e micrometástases ainda não foi totalmente elucidado (Hanahan e Weinberg, 2011). A teoria de vigilância imunológica propõe que as células e os tecidos são constantemente monitorados por um sistema imunológico cada vez mais eficaz, e que tal vigilância imunológica é responsável por reconhecer e eliminar a grande maioria das células incipientes no câncer. De acordo com essa teoria, os tumores sólidos não são detectados pelos vários mecanismos do sistema imunológico ou são capazes de limitar e evadir a erradicação pelo sistema imune (Hanahan e Weinberg, 2011). Os autores propõem que a associação entre a

inflamação e o desenvolvimento tumoral pode ocorrer por dois mecanismos. Um deles é dada por meio da ativação de diferentes classes de oncogenes, levando à expressão de genes específicos e subsequente desenvolvimento de um ambiente inflamatório; e outro no qual organismos externos estariam associados ao desenvolvimento do câncer, assim como os vírus. As conflitantes respostas inflamatórias nos tumores serão capazes de promover potenciais ferramentas de prognóstico e em terapias projetadas para redirecionar essas células para a destruição do tumor.

3.1. Associação dos miRNAs e expressão dos genes preditos

Foram observadas regiões alteradas com a presença de microRNAs (miRNAs) mapeados nos 32 casos de carcinoma de orofaringe avaliados. Os miRNAs são um grupo endógeno de moléculas de RNA fita simples, não codificantes, com tamanho variando de 18 a 24 nucleotídeos. Essa molécula foi primeiramente descrita em 1993, em *C. elegans*, e associada com a regulação do desenvolvimento desse micro-organismo (Lee *et al.*, 1993). O mecanismo de ação dos miRNAs se baseia na inibição translacional ou degradação do mRNA alvo pela ligação da sequência complementar na região 3' UTR (região não traduzida) do mRNA alvo (Bartel *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011).

Até abril de 2011, o banco de dados miRBase (v. 17; <http://www.mirbase.org/>) continha 16.772 miRNAs precursores (pré-miRNAs), que expressam 19.724 miRNAs maduros em 153 espécies. O genoma humano contém ~416 miRNA gênicos que codificam 1902 miRNA maduros distintos distribuídos em todos os cromossomos, com exceção do cromossomo Y. Aproximadamente 124 miRNA gênicos codificam um *cluster* de miRNA e produzem mais de 400 sequências de miRNA com menos de 10000pb de distância. Cada miRNA tem ~200 transcritos de RNA alvo, direta ou indiretamente, e mais de um terço do total de mRNAs humanos são preditos por mais de um miRNA (Selbach *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2008; Zheng e Wang, 2011).

No presente estudo foram identificados onze miRNAs mapeados em regiões alteradas por CGH-*array*. Nas regiões com maior frequência de ganhos genômicos estão mapeados três miRNAs, entre eles o miR-8 (1p36.33-p36.32), miR-548 e miR-612 (11q13.1-q13.3), além de oito mapeados em regiões de perdas genômicas,

compreendendo os miRNAs: MIR1299 (9q12), MIR1268 (15q11.1-q11.2), miR-662 (16p13.3) e miR-290, miR-373, miR-498, miR-515, MIR1323 (19q13.41). Esses miRNAs, juntos, regulam mais de 8.000 genes únicos com alto poder preditivo.

A perda dos miRNAs da família miR-8/200 é comumente observada em tumores humanos avançados (Valastyan and Weinberg, 2009) e correlacionada com o maior potencial invasivo, uma vez que ocorre a ausência da inibição dos indutores da transição epitélio-mesênquima (EMT) *ZEB1* e *ZEB2* (Christoffersen *et al.*, 2007; Hurteau *et al.*, 2007; Bracken *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2008; Korpál *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008) além da aquisição de propriedades similares às de células-tronco pela não repressão de *ZEB1* e *Bmi1* (Shimono *et al.*, 2009; Wellner *et al.*, 2009; Vallejo *et al.*, 2011). Apesar de uma maior frequência de ganhos encontradas para esse miRNA no presente estudo, aproximadamente 19% dos casos apresentaram perda para a região desse gene (6 dos 14 casos alterados), todos com estágio clínico III e IV. Além disso, na análise de expressão gênica global, não foi observada alteração nos níveis dos transcritos regulados por esse miRNA, como *ZEB1*, *ZEB2* e *Bmi1*, possivelmente pelo número de casos limitado em que essa alteração foi observada.

Os genes codificadores de miRNAs são frequentemente localizados em regiões ou sítios frágeis no DNA associados com CEs orais, entre eles o gene que codifica a família do miR-24, mapeado nos cromossomos 9q22 (miR-24-1) e 19p13 (miR-24-2). Apesar de não ter sido detectada alteração destes miRNAs no presente estudo, a região que compreende 9q22 (9q21.33-9q22.1) foi encontrada com perda em mais de 21% dos carcinomas de orofaringe avaliados por CGH-*array*. O miR-24 regula uma série de genes que controlam a progressão do ciclo celular e o reparo ao DNA, principalmente *E2F2* (Lal *et al.*, 2009-a), além de *MYC* e outros genes importantes na regulação do ciclo celular que são regulados por *MYC* e *E2Fs* (*AURKB*, *BRCA1*, *CCNA2*, *CDC2*, *CDK4* e *FEN1*). A perda ou diminuição da expressão desse miRNA leva à perda de regulação desses genes alvos resultando na proliferação celular anormal (Lal *et al.*, 2009-b). Interessantemente, o gene *E2F2*, regulado pelo miRNA-24, apresentou-se com aumento de expressão gênica no presente estudo. Assim, não pode ser descartado o envolvimento do miRNA-24 entre os carcinomas de orofaringe do presente estudo. Outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Além disso, outro sítio frágil comumente alterado em tumores humanos é 13q14, onde se mapeiam os miRNAs miR-15a e miR-16a, região essa deletada em mais da metade das leucemias linfocíticas crônicas de células B (Calin *et al.*, 2004). Embora tanto o miR-15a e miR-16a são abundantemente expressos em tecidos normais, estudos da assinatura dos miRNAs associados ao câncer indicam que o *cluster* formado por esses miRNAs está com a expressão diminuída em diversos tipos de tumores humanos, entre eles o linfoma linfocítico crônico (CLL), adenomas da glândula pituitária e carcinoma de próstata. Os miR-15a e miR-16a atuam regulando diversos oncogenes, incluindo *BCL2*, *MCL1*, *CCND1* e *WNT3A* (Aqeilan *et al.*, 2010; Zheng e Wang, 2011). No presente estudo, a região que compreende 13q14 (13q11-13q22.1) estava perdida em aproximadamente 22% dos tumores avaliados, sendo incluída como um sítio frágil para tumores de orofaringe.

Além de regular a progressão do ciclo celular, proliferação e diferenciação, apoptose e senescência celular, os miRNAs foram associados à etiologia dos tumores malignos, sua progressão, metástase e prognóstico, atuando como oncogenes (entre eles miR-17-92, miR-21, miR155, miR-372/373) ou supressores tumorais (entre eles let-7, miR-15a/16-1, miR-34a, miR-143/145), por meio da modulação de vias oncogênicas ou supressoras tumorais, incluindo as vias Ras, Myc, p53 e pRB (Di Leva *et al.*, 2010; Farazi *et al.*, 2011; Zheng e Wang, 2011). No presente estudo, o miR-373 (19q13.41) foi encontrado mais frequentemente em perda nos casos de orofaringe, assim como o miR-520c, pertencente à família do miR-515. Seu potencial oncogênico foi primeiramente investigado em tumores de células germinativas testiculares, promovendo proliferação celular e carcinogênese de células humanas primárias por meio da inibição da expressão de *LAST2*, um supressor tumoral, para neutralizar a inibição de CDK mediada por p53 (Voorhoeve *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2011).

Relatos mais recentes demonstraram que o miR-373 poderia estimular a invasão e metástase de tumores de mama e próstata em parte pela inibição direta da expressão de CD44, baseado na análise da expressão gênica por cDNA *microarray* (Huang *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2011). Em adição, Yang *et al.* (2009) demonstraram a diminuição dos miR-373 e miR-520c (família miR-515) em tumores de próstata comparados com o tecido adjacente benigno. Ambos os miRNAs avaliados suprimiram totalmente a proteína CD44, demonstrando que os miR-373 e miR-520c, como a maioria dos miRNAs, inibem seus alvos e, sendo CD44 um supressor tumoral,

esses miRNAs atuam como oncogenes (oncomiRs), apesar da diminuição de sua expressão (Yang *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços das metodologias de cDNA *microarray* para avaliar as alterações dos níveis de expressão gênica, existe uma limitação da técnica, que só determina os mRNAs alvos dos miRNAs que são clivados e degradados por estes. Entretanto, a maioria dos miRNAs nas células animais regulam a expressão gênica de seus alvos pela inibição translacional (pós-transcricional) ao invés da degradação de seu alvo (Yan *et al.*, 2011). Como proposto por Huang *et al.* (2008), apenas um subgrupo de genes alvos relevantes podem ser identificados baseados na análise de expressão gênica por cDNA *microarray*.

Uma boa metodologia para validação da análise integrada seria a avaliação proteômica dos genes alvos regulados por miRNAs alteradas. Assim, a relação “causa e efeito” poderia ser estabelecida, caso os níveis protéicos dos alvos estivessem alterados, independente da expressão gênica, comprovando a atuação dos miRNAs em nível pós-transcricional.

Em resumo, neste estudo foi relatado o perfil genômico dos pacientes com carcinoma de orofaringe detectados por CGH-*array* sendo apresentadas as alterações mais características destes tumores. Muitos dos achados são concordantes com outros relatos em literatura. Aqui também foi descrita uma abordagem baseada na resposta ao tratamento proposto associado à carboplatina, comparando os grupos de pacientes que apresentaram doença progressiva daqueles que responderam ao tratamento (RC ou RP), revelando marcadores putativos de resposta a terapia. Foi analisado o perfil genômico diferencial entre pacientes HPV positivo (12 casos) e negativos (20 casos), confirmando dados em literatura que revelam que casos positivos apresentam um perfil genômico menos complexo, além de alterações genômicas que distinguem molecularmente esses dois grupos de tumores. Além disso, foi realizada a análise de expressão de transcritos em larga escala em 22 casos de CE de orofaringe seguida da análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos. Nessa correlação foram consideradas vinte e duas amostras avaliadas pelas duas metodologias. Os resultados revelaram 22 genes moduladores que podem ter um papel relevante em carcinomas de orofaringe e contribuir para o conhecimento deste grupo particular de tumores.

Conclusões

CONCLUSÕES

Foram identificadas 3222 alterações no número de cópias genômicas. As alterações mais frequentes envolveram ganhos nas regiões cromossômicas 3q, 5p, 8q, 9q e 11q e perdas nas regiões 3p, 5q, 8p, 9p e 18q, regiões essas que compreendem importantes genes candidatos a marcadores moleculares desse subtipo tumoral.

Os casos HPV negativos (20) apresentaram um maior número de CNAs (média 117 CNAs/caso) comparadas aos pacientes HPV positivos (12), os quais mostraram um perfil genômico menos complexo (média 73 CNAs/caso).

Perdas em 7q22.1 e 14q12 foram identificadas exclusivamente nos tumores HPV positivos, revelando marcadores que podem ser úteis para o delineamento de estratégias terapêuticas neste grupo de pacientes.

Os tumores com RC à carboplatina apresentaram perfil genômico menos complexo quando comparados aos demais. Perdas em 1p21.3-p21.2, 1p21.2-p21.1 e 1p21.1 e ganhos em 10p13-p12.33 e 10p12.31-p12.1 estavam alteradas exclusivamente nos casos que não apresentaram RC (RP e DP). Essas regiões podem caracterizar importantes marcadores de resposta à QT e RT.

A análise de expressão gênica global revelou 1937 genes diferencialmente expressos relacionados com o desenvolvimento e a progressão tumoral, principalmente com doença imunológica; câncer, doença genética e ciclo celular; morte celular, expressão gênica e mecanismo de infecção; morfologia, crescimento e proliferação celular.

A análise dos CEOs na presença (9 casos) ou ausência de HPV (13 casos) identificou 54 genes diferencialmente expressos e que apresentavam funções conhecidas entre os dois grupos, sugerindo uma etiologia tumoral diferenciada entre os tumores HPV positivos e negativos.

A integração dos dados genômicos e transcriptômicos revelou 22 genes moduladores, entre eles, 16 apresentaram concordância direta entre a alteração genômica e transcriptômica (ganho genômico e aumento de expressão).

Vários miRNAs que se mapeavam em regiões envolvidas em perdas ou ganhos genômicos foram avaliados *in silico*, podendo ser potenciais reguladores de

transcritos específicos, principalmente daqueles que não foram concordantes na análise integrada.

A associação entre as alterações genômicas e transcriptômicas permitiu a identificação de genes que podem ser marcadores biológicos úteis para auxiliar na conduta terapêutica dos CEOs e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- ADELSTEIN DJ, RICE TW, RYBICKI LA, *et al.* Does paclitaxel improve the chemoradiotherapy of locoregionally advanced esophageal cancer? A nonrandomized comparison with fluorouracil-based therapy. *J Clin Oncol.* 2000;18:2032-9.
- ADELSTEIN DJ, SAXTON JP, LAVERTU P, *et al.* A phase III randomized trial comparing concurrent chemotherapy and radiotherapy with radiotherapy alone in resectable stage III and IV squamous cell head and neck cancer: preliminary results. *Head Neck.* 1997;19:567-75.
- ADJEI AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1062-74.
- AKAVIA UD, LITVIN O, KIM J, *et al.* An integrated approach to uncover drivers of cancer. *Cell.* 2010 Dec 10;143(6):1005-17.
- AKERVALL J, GUO X, QIAN CN, *et al.* Genetic and expression profiles of squamous cell carcinoma of the head and neck correlate with cisplatin sensitivity and resistance in cell lines and patients. *Clin. Cancer Res.* 2004;10: 8204-13.
- AL-SARRAF M, LEBLANC M, GIRI PG, *et al.* Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol* 1998;16: 1310-7.
- ALVAREZ H, OPALINSKA J, ZHOU L, *etal.* Widespread hypomethylation occurs early and synergizes with gene amplification during esophageal carcinogenesis. *PLoS Genet.* 2011 Mar;7(3):e1001356.
- ALLI E, BASH-BABULA J, YANG JM, HAIT WN. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62:6864-9.
- ALLI E, YANG JM, FORD JM, HAIT WN. Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 2007;71:1233-40.
- AMBATIPUDI S, GERSTUNG M, GOWDA R, *et al.* Genomic profiling of advanced-stage oral cancers reveals chromosome 11q alterations as markers of poor clinical outcome. *PLoS One.* 2011;6:e17250.
- AMBROSINI G, SAMBOL EB, CARVAJAL D, *et al.* Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene.* 2007;26:3473-81.
- AMBROSIO EP, ROSA FE, DOMINGUES MA, *et al.* Cortactin is associated with perineural invasion in the deep invasive front area of laryngeal carcinomas. *Hum. Pathol.* 2011. [Epub ahead of print]
- ANDL T, KAHN T, PFUHL A, *et al.* Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Research.* 1998, 58:5-13.
- ANG KK, HARRIS J, WHEELER R *et al.* "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 1, pp. 24-35, 2010.

- AQEILAN RI, CALIN GA, CROCE CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ.* 2010;17:215–20.
- ARGIRIS A, KARAMOUZIS MV, RABEN D, FERRIS RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371:1695-709.
- ASAI K, HIRABAYASHI T, HOUJOU T, *et al.* Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2003;278:8809–14.
- BAEK D, VILLEN J, SHIN C, *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature.* 2008;455:64–71.
- BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 2002;115:3719–27.
- BALDWIN C, GARNIS C, ZHANG L, *et al.* Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. *Cancer Res.* 2005;65:7561-7.
- BANEZ-CORONEL M, RAMIREZ DE MOLINA A, RODRIGUEZ-GONZALEZ A, *et al.* Choline Kinase Alpha Depletion Selectively Kills Tumoral Cells. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2008;8:709-19.
- BAO GC, WANG JG, JONG A. Increased p21 expression and complex formation with cyclin E/CDK2 in retinoid-induced pre-B lymphoma cell apoptosis. *FEBS Lett.* 2006. 580;5:3687-93.
- BARNES L, JOHNSON JT. Clinical and pathological considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part II. *Pathol Annu.* 1986;21 Pt 2:83-110. Review.
- BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97. 2
- BATEMAN J & VAN VACTOR D. The Trio family of guanine-nucleotide exchange factors: regulators of axon guidance. *J Cell Science.* 2001;114:1973-80.
- BAUER VL, BRASELMANN H, HENKE M, *et al.* Chromosomal changes characterize head and neck cancer with poor prognosis. *J Mol Med.* 2008;86:1353-65.
- BAUER VL, BRASELMANN H, HENKE M, *et al.* Chromosomal changes characterize head and neck cancer with poor prognosis. *J. Mol. Med.* 2008;86:1353-65.
- BEENKEN A e MOHAMMADI M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2009;8:235–53.
- BERNHARD EJ, MCKENNAWG, MUSCHEL RJ. Radiosensitivity and the cell cycle. *Cancer J. Sci. Am.* 1999;5:194-204.
- BEROUKHIM R, GETZ G, NGHIEMPHU L, *et al.* Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:20007-12.
- BIERIE B, MOSES HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006;6:506–20.
- BLOT WJ, MCLAUGHLIN JK, WINN DM, *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 3282–87.

- BOCCARDO E, MANZINI BALDI CV, CARVALHO AF, *et al.* Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor- α . *Carcinogenesis* 2010; 31:521-31.
- BOCHMÜHL U, SCHLUNS K, KUCHLER I, PETERSEN S, PETERSEN I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. *Am J Pathol.* 2000. 157:369-75.
- BONNER JA, HARARI PM, GIRALT J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab and cisplatin for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-78.
- BORGOÑO CA, IACOVOS PM, ELEFTHERIOS PD. Human tissue kallikreins: Physiologic roles and applications in cancer. *Mol. Cancer Res.* 2004;2:257-80.
- BOURHIS J, OVERGAARD J, AUDRY H, *et al.* Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* 2006;368:843-54.
- BOZEC A, FORMENTO P, LASSALLE S, *et al.* Dual inhibition of EGFR and VEGFR pathways in combination with irradiation: antitumour supra-additive effects on human head and neck cancer xenografts. *Br. J. Cancer.* 2007;97:65-72.
- BRACKEN CP, GREGORY PA, KOLESNIKOFF N, *ET AL.* A DOUBLE-NEGATIVE FEEDBACK LOOP BETWEEN ZEB1-SIP1 AND THE MICRORNA-200 FAMILY REGULATES EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION. *CANCER RES.* 2008;68:7846-54.
- BRINCKERHOFF CE, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3:207-14.
- BUDACH W, HEHR T, BUDACH V, *et al.* A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer* 2006;6:28.
- BUIRET G, COMBE C, FAVREL V, *et al.* A retrospective multicenter study of the tolerance of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil followed by radiotherapy with concomitant cetuximab in 46 cases of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77:430-7.
- CALAIS G, ALFONSI M, BARDET E, *et al.* Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 1999;91:2081-6.
- CALIFANO J, VAN DER RIET P, WESTRA W, *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56:2488-92.
- CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:2999-3004.
- CAMPISI G e GIOVANNELLI L: Commentary. Controversies surrounding human papillomavirus infection, head & neck vs oral cancer, implication for prophylaxis and treatment. *Head and Neck Oncology* 2009, I: 8
- CAPODICCI C, PILLINGER MH, HAN G, *et al.* Integrin-dependent homotypic adhesion of neutrophils. Arachidonic acid activates Raf-1/Mek/Erk via a 5-lipoxygenase-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 1998;102:165-75.

- CARVALHO AL, KOWALSKI LP, AGRA IM, *et al.* Treatment results on advanced neck metastasis (N3) from head and neck squamous carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:862-8.
- CLEMENTS JA, WILLEMSSEN NM, MYERS SA, DONG Y. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit. Ver. Clin. Lab. Sci.* 2004;41:265-312.
- COE BP, HENDERSON LJ, GARNIS C, *et al.* High-resolution chromosome arm 5p array CHG analysis of small cell lung carcinoma cell lines. *Genes, Chromosomes Cancer.* 2005;42:308-13.
- COUTURE C, RAYBAUD-DIOGÈNE H, TÊTU B, *et al.* p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer.* 2002;94:713-22.
- CURADO MP, EDWARDS B, SHIN HR, *et al.* Cancer Incidence in Five Continents, vol. IX. No. 160, Lyon, IARC: IARC Scientific Publications; 1980.
- CURRAN D, GIRALT J, HARARI PM, *et al.* Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25:2191-7.
- CHA JD, KIM HJ, CHA IH. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Feb 18. [Epub ahead of print]
- CHARALAMBOUS C, PEN LB, SU YS, *et al.* Interleukin-8 differentially regulates migration of tumor-associated and normal human brain endothelial cells. *Cancer Res.* 2005;65:10347-54.
- CHARI R, THU KL, WILSON IM, *et al.* Integrating the multiple dimensions of genomic and epigenomic landscapes of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Mar;29(1):73-93.
- CHEN C, MÉNDEZ E, HOUCK J, *et al.* Gene Expression Profiling Identifies Genes Predictive of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(8):OF1-11
- CHO YJ, TSHERNIAK A, TAMAYO P, *et al.* Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 10;29(11):1424-30.
- CHOONG N, VOKES E. Expanding role of the medical oncologist in the management of head and neck cancer. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:32-53.
- CHRISTIANSEN JJ, RAJASEKARAN AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006;66:8319-8326.
- CHRISTOFFERSEN NR, SILAHTAROGLU A, OROM UA, *et al.* miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA.* 2007;13:1172-8
- CHUNG CH e GILLISON ML. "Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 22, pp. 6758-6762, 2009.

- CHUNG CH e GILLISON ML. "Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 22, pp. 6758–6762, 2009.
- CHUNG CH, PARKER JS, ELY K, *et al.* Gene Expression Profiles Identify Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Activation of Nuclear Factor-KB Signaling as Characteristics of a High-risk Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66:8210-8.
- CHUNG CH, PARKER JS, KARACA G, *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell.* 2004;5:489–500.
- D'SOUZA G, AGRAWAL Y, HALPERN J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1263-1269.
- D'SOUZA G, KREIMER AR, VISCIDI R, *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356:1944-56.
- DAHLGREN L, DAHLSTRAND HM, LINDQUIST D, *et al.* Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer.* 2004;112:1015-9.
- DAI M, CLIFFORD GM, LE CALVEZ F, *et al.*, "Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study," *Cancer Research*, vol. 64, no. 2, pp. 468–471, 2004.
- DATABASE OF GENOMIC VARIANTS.* <http://projects.tcag.ca/variation/>
- DAYYANI F, ETZEL CJ, LIU M, *et al.* Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010;29:2-15.
- DE ARAUJO VC, PINTO JÚNIOR DS, DE SOUSA SO, *et al.* Vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250:105–109.
- DE SMITH AJ. *et al.* Small deletion variants have stable breakpoints commonly associated with Alu elements. *PLoS ONE* 3, e3104 (2008).
- DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BernardHU, zurHausen H. Classification of papilloma-viruses. *Virology* 2004;324:17–27.
- DEL CAMPO JM, PRAT A, GIL-MORENO A, PEREZ JPARERA M. Update on novel therapeutic agents for cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008;110:S72–6.
- DENIS F, GARAUD P, BARDET E, *et al.* Final results of the 94-01 French head and neck oncology and radiotherapy group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2004;22: 69-76.
- DI LEVA G, CROCE CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol. Med.* 2010;16:257–67.
- DIJKEMA IM, STRUIKMANS H, DULLENS HF, *et al.* Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2000;36:54-60.

- DU L, LYLE CS, OBEY TB, *et al.* Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem* 2004;279:11957-66.
- DUENSING S, MUNGER K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004;109:157-62.
- DUSING MR, MAIER EA, ARONOW BJ, WIGINTON DA. Onecut-2 knockout mice fail to thrive during early postnatal period and have altered patterns of gene expression in small intestine. *Physiol. Genomics*. 2010;42:115-25.
- DUVVURI U, MYERS JN. Contemporary management of oropharyngeal cancer: anatomy and physiology of the oropharynx. *Curr Probl Surg*. 2009;46:119-84.
- ERKAL HS, SERIN M, AMDUR RJ, *et al.* Squamous cell carcinomas of the soft palate treated with radiation therapy alone or followed by planned neck dissection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:359-66.
- EYMIN B e GAZZERI S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. *Cell Adh Migr*. 2010;4:114-23.
- FAKHRY C, GILLISON ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*. 2006;24:2606-11.
- FAKHRY C, WESTRA WH, LI S, *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:261-9.
- FARAZI TA, SPITZER JI, MOROZOV P, TUSCHL T. miRNAs in human cancer. *J. Pathol*. 2011;223:102-15.
- FARSHCHIAN M, KIVISAARI A, ALA-AHO R, *et al.* Serpin Peptidase Inhibitor Clade A Member 1 (SerpinA1) A Novel Biomarker for Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Am. J. Pathol*. 2011 Jun 30. [Epub ahead of print].
- FEI J, HONG A, DOBBINS TA, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinomas of the tonsil in relation to human papillomavirus status and epidermal growth factor receptor. *Ann. Surg. Oncol*. 2009;16:2908-17.
- FERBER MJ, THORLAND EC, BRINK AA, *et al.* Preferential integration of humanpapillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene*. 2003;22:7233-42.
- FISCHER CA, ZLOBEC I, GREEN E, *et al.* Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int. J. Cancer*. 2010;126:1256-62.
- FLETCHER GH, LINDBERG RD. Squamous cell carcinomas of the tonsillar area and palatine arch. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1966;96:574-87.
- FORASTIERE A, KOCH W, TROTTI A, *et al.* Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001;345:1890-900.
- FRISCH M, BIGGAR RJ. A etiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet*. 1999;354:1442-3.

- FURUNO K, IKEDA K, HAMANO S, *et al.* Oncut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. *Genes Immun.* 2008;9:302-8.
- GALLO O, BODDI V, CALZOLARI A, *et al.* bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 1996;2:261-7.
- GALLO O, CHIARELLI I, BODDI V, *et al.* Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy. *Int J Cancer.* 1999;84:573-9.
- GARAVELLO W, BERTUCCIO P, LEVI F, *et al.* The Oral Cancer Epidemic In Central And Eastern Europe. *Int J Cancer.* 2010;127:160-171.
- GARNIS C, BALDWIN C, ZHANG L, *et al.* Use of Complete Coverage Array Comparative Genomic Hybridization to Define Copy Number Alterations on Chromosome 3p in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 2003;63:8582-5.
- GARNIS C, CAMPBELL J, ZHANG L, *et al.* CGH array: an oral cancer genomic regional array for comparative genomic hybridization analysis. *Oral Oncol.* 2004(a):40:511-9.
- GILLES C, POLETTE M, MESTDAGT ME, *et al.* Transactivation of vimentin by b-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:2658-2664.
- GILLES C, POLETTE M, PIETTE J, *et al.* Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol* 1996;180:175-180.
- GILLES C, POLETTE M, ZAHM JM, *et al.* Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 1999;112:4615-4625.
- GILLISON ML, D'SOUZA G, WESTRA W, *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:407-420.
- GILLISON ML, HARRIS J, WESTRA W, *et al.* Survival outcomes by tumor human papillomavirus(HPV) status in stage III-IV oropharyngeal cancer (OPC) in RTOG 0129. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2009;27:6003
- GILLISON ML, KOCH WM, CAPONE RB, *et al.*, "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 92, no. 9, pp. 709-720, 2000.
- GILLISON ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol.* 2004 Dec;31(6):744-54. Review.
- GOH XY, REES JR, PATERSON AL, *et al.* Integrative analysis of array-comparative genomic hybridisation and matched gene expression profiling data reveals novel genes with prognostic significance in oesophageal adenocarcinoma. *Gut.* 2011 Apr 12.
- GOKER E, WALTHAM M, KHERADPOUR A, *et al.* Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood.* 1995;86:677-84.

- GOMES LI, ESTEVES GH, CARVALHO AF, *et al.* Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. *Cancer Res* 2005; 65:7127-36.
- GOMEZ-ROMAN JJ, SAENZ P, MOLINA M *et al.* Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:459-65.
- GORLICK R, GOKER E, TRIPPETT T, *et al.* Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1996;335:1041-8.
- GORRE ME, MOHAMMED M, ELLWOOD K, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, *Science* 2001;293:876-80.
- GRABENBAUER GG, MÜHLFRIEDEL C, RÖDEL F, *et al.* Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48:1041-50.
- GREGORY PA, BERT AG, PATERSON EL, *et al.* (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10: 593-601.
- GROSS ND, BOYLE JO, DU B, *et al.* Inhibition of Jun NH2-terminal kinases suppresses the growth of experimental head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:5910-7.
- HA PK, CALIFANO JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006;7:77-82.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74. Review.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
- HASHIBE M, BOFFETTA P, ZARIDZE D, *et al.* Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 696-703.
- HASTINGS PJ, LUPSKI JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet.* 2009;10:551-64.
- HAVRE PA, YUAN J, HEDRICK L, *et al.* "p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells," *Cancer Research*, vol. 55, no. 19, pp. 4420-4424, 1995.
- HAWKINS RD, HON GC, REN B. Next generation genomics: an integrative approach. *Nat Rev Genet.* 2010; 11:476-86.
- HERNANDO E, SARMENTERO-ESTRADA J, KOPPIE T, *et al.* A critical role for choline kinase-alpha in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene.* 2009;28:2425-35.
- HIGO M, UZAWA K, KOUZU Y, *et al.* Identification of candidate radioresistant genes in human squamous cell carcinoma cells through gene expression analysis using DNA microarrays. *Oncology Report.* 2005;14:1293-8.

- HOCHOL A, NERI G, JEDRZEJCZAK N, *et al.* Effects of galanin on the secretion and proliferative activity of the immature and regenerating adrenal glands of rats. *Peptides*. 2000;21:147–50.
- HU W, CHAN CS, WU R, *et al.* Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol. Cell*. 2010;38:689-99.
- HUANG Q, GUMIREDDY K, SCHRIER M, *et al.* The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat. Cell Biol*. 2008;10:202-10.
- HUBER MA, KRAUT N, BEUG H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548–558.
- HUNTLEY SP. *et al.* Attenuated type II TGF- β receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination. *Int. J. Cancer* 110, 170–176 (2004).
- HURTEAU GJ, CARLSON JA, SPIVACK SD, BROCK GJ. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res*. 2007;67:7972–6.
- IA COUR JM, HOJ BR, MOLLERUP J, *et al.* The apoptosis linked gene ALG-2 is dysregulated in tumors of various origin and contributes to cancer cell viability. *Mol Oncol*. 2008;1:431-439.
- Ikushima, H, Miyazono K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10:415–24.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. 2010
- IORIO E, MEZZANZANICA D, ALBERTI P, *et al.* Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res*. 2005;65:9369-76.
- IRIÉ T, AIDA T, TACHIKAWA T. Gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma using laser microdissection and cDNA microarray. *Med Electron Microsc*. 2004;37:89-96.
- IRIZARRY RA, LADD-ACOSTA C, WEN B, *et al.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet*. 2009;41:178–186
- ISLAM S, KIM JB, TRENDEL J, *et al.* Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biochem* 2000;78:141–150.
- JABBAR S, STRATI K, SHIN MK, *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology*. 2010 Aug 24. [Epub ahead of print]
- JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, *et al.* Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
- JEMAL A, SIEGEL R, XU J, *et al.* Cancer Statistics, 2010. *Ca Cancer J Clin* 2010;60:277–300.

- JEREMIC B, SHIBAMOTO Y, MILICIC B, *et al.* Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 2000;18:1458-64.
- JIN X, CHENG H, CHEN J, *et al.* RNF13: an emerging RING finger ubiquitin ligase important in cell proliferation. *The FEBS Journal*. 2011;278:78-84.
- JIANG L, GONDA TA, GAMBLE MV, *et al.* Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res*. 2008;68:9900-8.
- JOHNSEN JI, AURELIO ON, KWAJA Z, *et al.* p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest. *Int. J. Cancer*. 2000;88:685-91.
- JOHNSON DE e WILLIAMS LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res*. 1993;60:1-41.
- JÖNSSON G, STAAF J, VALLON-CHRISTERSSON J, *et al.* Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R42.
- JORDAN RC, CATZAVELOS GC, BARRETT AW, *et al.* Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996;32B:394-400.
- JUNG AC, BRIOLAT J, MILLON R, *et al.* Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126:1882-94.
- KAINUMA K, KATSUNO S, HASHIMOTO S, *et al.* Differences in the expression of genes between normal tissue and squamous cell carcinomas of head and neck using cancer-related gene cDNA microarray. *Acta Otolaryngol*. 2006;126:967-74.
- Karius T, Schnekenburger M, Ghelfi J, *et al.* Reversible epigenetic fingerprint-mediated glutathione-S-transferase P1 gene silencing in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2011;81:1329-42.
- KERBEL RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358:2039-49.
- KIM B, DILLMAN RO, CHEN P, *et al.* A retrospective study of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil followed by concurrent radiotherapy with cetuximab in locally advanced head and neck cancer. *American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery* xx (2011).
- KLIGYS K, CLAIBORNE JN, DEBIASE PJ, *et al.* The slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility behavior of keratinocytes. *J. Biol. Chem*. 2007;282:32520-8.
- KLUSSMANN JP, MOOREN JJ, LEHNEN M, *et al.* Genetic Signatures of HPV-related and Unrelated Oropharyngeal Carcinoma and their prognostic implications. *Imaging, Diagnosis, Prognosis*. 2009; 15(5): 1779-1786.
- KNEZEVICH SR, MCFADDEN DE, TAO W, *et al.* A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat. Genet*. 1998;18:184-7.
- KOHNO N. The role of chemotherapy for advanced oro and hypopharyngeal cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:113-8.

- KOKOGLU E, TUTER Y, YAZICI Z, *et al.* Profiles of the fatty acids in the plasma membrane of human brain tumors. *Cancer Biochem. Biophys.* 1998;16:301–12.
- KONDOH N, OHKURA S, ARAI M *et al.* Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43:455–62.
- KORPAL M, LEE ES, HU G, KANG Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 2008;283:14910–4.
- KOWALSKI LP, FRANCO EL, TORLONI H, *et al.* Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30B:167-73.
- KOWALSKI LP, GONÇALVES FILHO J, PINTO CA, *et al.* Long-term survival rates in young patients with thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:746-9.
- KREIMER AR, CLIFFORD GM, BOYLE P, *et al.* Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:467-75.
- KUJAWSKI M, JARMUZ M, RYDZANICZ M, *et al.* Frequent chromosome Y loss in primary, second primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Lett.* 2004;208:95-101.
- KUMAR B, CORDELL KG, LEE JS, *et al.* EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3128–37.
- LACAL JC. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *Idrugs.* 2001;4:419-26.
- LACY PD, SPITZNAGEL EL JR, Piccirillo JF. Development of a new staging system for recurrent oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1999;86:1387-95.
- LAL A, NAVARRO F, MAHER CA, *et al.* miR-24 Inhibits Cell Proliferation by Targeting E2F2, MYC, and Other Cell-Cycle Genes via Binding to “Seedless” 3’UTR MicroRNA Recognition Elements. *Molecular Cell.* 2009;35:610-25 (b).
- LAL A, PAN Y, NAVARRO F *et al.* miR-24-mediated down-regulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16:492–8 (a).
- LANE J, MARTIN TA, MANSEL RE, *et al.* The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *International Seminars in Surgical Oncology.* 2008;5:23.
- LASSEN P, ERIKSEN JG, HAMILTON-DUTOIT S, *et al.* Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2009;27:1992–8.
- LASSEN U, JENSEN LH, SORENSEN M, *et al.* A Phase I-II dose escalation study of fixed-dose rate gemcitabine, oxaliplatin and capecitabine every two weeks in advanced cholangiocarcinomas. *Acta. Oncol.* 2010 Jul 29. [Epub ahead of print].

- LAU YF. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64:921–927.
- LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.
- LEE SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:61-86.
- LEE SY, PARK SY, KIM S-H, CHOI EC. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Squamous Cell Carcinoma of the Tonsil and Their Clinical Significance. *Clinical and Exp. Otorhinolaryngology.* 2011;2: 88-94.
- LEE, JA., CARVALHO, CM, LUPSKI, JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131, 1235–1247 (2007). Description of the complex structure and microhomology of non-recurrent duplications seen in patients with a genomic disorder.
- LEEMANS CR, BRAAKHUIS BJ, BRAKENHOFF RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jan;11(1):9-22.
- LI A, DUBEY S, VARNEY ML, *et al.* IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* 2003;170:3369-76.
- LI LW, LI YY, LI XY, *et al.* A novel tumor suppressor gene *ECRG4* interacts directly with *TMPRSS11A* (*ECRG1*) to inhibit cancer cell growth in esophageal carcinoma. *BMC Cancer.* 2011;11:52-9.
- LICITRA L, PERRONE F, BOSSI P, *et al.* High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:5630–6.
- LIN J, LIN L, THOMAS DG, *et al.* Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel *MAGE-A10* splice variants. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:5708–16.
- LIN J, LIU C, GE L, *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts promotes the proliferation of a lingual carcinoma cell line by secreting keratinocyte growth factor. *Tumour Biol.* 2011;32:597-602.
- LINDBERG R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer.* 1972;29:1446-9.
- LINDEL K, BEER KT, LAISSUE J, *et al.* Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001;92:805-13.
- LIU CJ, LIN SC, CHEN YJ, *et al.* Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog.* 2006;45:721-31.
- LIU H *et al.* Cloning of new related to human esophageal carcinoma and its expression in the human esophageal carcinoma. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1999;40, 36, 239.
- LIU LK, JIANG XY, ZHOU XX, *et al.* Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell

- carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol.* 2010;23:213-24.
- LOHAVANICHBUTR P, HOUCK J, FAN W, *et al.* Genomewide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135:180-8.
- MANDAL M, MYERS JN, LIPPMAN SM, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* 2008;112:2088-2100.
- MARKLUND L, HAMMARSTEDT L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol.* 2011;2011:509036.
- MARTIN SG, ORRIDGE C, MUKHERJEE A, MORGAN DA. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome after primary radiotherapy for head and neck squamous cell cancer. *Clin. Oncol. (R Coll Radiol).* 2007;19:71-6.
- MARTINEZ I, WANG J, HOBSON KF, *et al.* Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer.* 2007;43:415-32.
- MASSAGUÉ J. TGFb in cancer. *Cell.* 2008;134:215-30.
- MAYNE ST, MORSE D, WINN D. Cancers of The Oral Cavity And Pharynx. In: Schotten-Feld D, Fraumeni Jf Jr, Eds. *Cancer Epidemiology And Prevention.* 3rd Ed. Oxford: Oxford University Press; 2006:674-696.
- MCDONALD JS, JONES H, PAVELIC ZP, *et al.* Immunohistochemical detection of the H-ras, K-ras, and N-ras oncogenes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Oral Pathol.* 1994;23:342-6.
- MCKEAN-COWDIN R *et al.* Declining cancer rates in the 1990s. *J Clin Oncol* 2000;18(11):2258-68.
- MCLAUGHLIN-DRUBIN ME, MUNGER K. Oncogenicactivities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 2009;143:195-208.
- MCPHERRON AC, LAWLER AM & LEE SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 1997;387:83-90.
- MEDLEY QG, BUCHBINDER EG, TACHIBANA K, *et al.* Signalling between focal adhesion kinase and Trio. *J Biol Chem.* 2003;278:I3265-I3270.
- MELLIN H, FRIESLAND S, LEWENSOHN R, *et al.* Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer.* 2000;89(3):300-4.
- MENDENHALL WM, MENDENHALL CM, MALYAPA RS, *et al.* Re-irradiation of head and neck carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2008;31(4):393-8.
- MERLANO M, BENASSO M, CORVÒ R, *et al.* Five-year update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:583-9.

- MHAWECH-FAUCEGLIA P, FISCHER G, ALVAREZ JrV, *et al.* Predicting outcome in minimally invasive (T1a and T1b) urothelial bladder carcinoma using a panel of biomarkers: a high throughput tissue microarray analysis. *BJU Int.* 2007;100:1182-7.
- miRBase DATABASE. <http://www.mirbase.org/>. Acessado em 13 de junho de 2011.
- MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, *et al.* Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9:1799-805.
- MOK TS, WU YL, THONGPRASERT S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009 Sep 3;361(10):947-57.
- MONDELLO C, SMIRNOVA A, GIULOTTO E. Gene amplification, radiation sensitivity and DNA double-strand breaks *Mutation Research.* 2010;704:29-37.
- MUÑOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSÉ S, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. *N Engl J Med* 2003 Feb 6, 348(6):518-27.
- MUTALLIP M, NOHATA N, HANAZAWA T, *et al.* Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) suppresses cell apoptosis and its regulation by miR-133α in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Int J Mol Med.* 2011;27:345-52.
- NAKAGAMI K, UCHIDA T, OHWADA S, *et al.* Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999;90:419-24.
- NAKAMURA M, NAKATANI K, UZAWA K, *et al.* Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line, H-1R *Oncology Reports.* 2005;14: 1281-86.
- NARUISHI K, NISHIMURA F, YAMADA-NARUISHI H, *et al.* C-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP600125, blocks interleukin (IL)-6-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production: cyclosporine A partially mimics this inhibitory effect. *Transplantation.* 2003;76:1380-2.
- NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN), 2008.
- NAZMUL-HOSSAIN ANM, PATEL KJ, RHODUS NL, *et al.* Microarrays: applications in dental research. *Oral Diseases.* 2008;14: 25-9.
- NEVINS JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics.* 2001;10:699-703.
- NGUYEN DQ, WEBBER C, PONTING CP. Bias of selection on human copy-number variants. *PLoS Genet.* 2, e20 (2006).
- NOBILE C. *et al.* Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum. Genet.* 110, 418-421 (2002).
- O'REGAN EM, TONER ME, SMYTH PC, *et al.* Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients. *Head Neck.* 2006;28:330-8.

- O'REGAN EM, TONER ME, FINN SP, *et al.* p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2008;39:452-8.
- OEHLRICH N, DEVITT G, LINNEBACHER M, *et al.* Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-Lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2005;117:256-64.
- OLIVIERI EH, DA SILVA SD, MENDONÇA FF, *et al.* CYP1A2*1C, CYP2E1*5B, and GSTM1 polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2009;45(9):e73-9.
- OLSHEN AB, VENKATRAMAN ES, LUCITO R, WIGLER M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics.* 2004;5(4):557-72.
- ONESTO C, HANNOUN-LÉVI JM, CHAMOREY E, *et al.* Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. *Br. J. Cancer.* 2006;94:1516-23.
- OREND G, CHIQUET-EHRISMANN R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* 2006;244:143-163.
- PACCIONE RJ, MIYAZAKI H, PATEL V, *et al.* Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2894-2903.
- PALIOURAS M, BORGONO C, DIAMANDIS EP. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Letters.* 2004;249:61-79.
- PAMPALAKIS G, SOTIROPOULOU G. Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysic Acta.* 2007;1776:22-31.
- PANNONE G; SANTORO A; PAPAGERAKIS S; *et al.* The role of Human Papillomavirus in the pathogenesis of Head & Neck Squamous Cell Carcinoma: an overview; *Infectious Agents and Cancer* 2011, 6:4 doi:10.1186/1750-9378-6-4
- PARK SM, GAUR AB, LENGYEL E, PETER ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008;22:894-907.
- PARMIGIANI G, BOCA S, LIN J, *et al.* Design and analysis issues in genome-wide somatic mutation studies of cancer. *Genomics.* 2009;93:17-21.
- PATHARE S, SCHAFFER AA, BEERENWINKEL N, *et al.* Construction of oncogenetic tree models reveals multiple pathways of oral cancer progression. *Int J Cancer.* 2009;125:2864-2871.
- PATHARE SM, GERSTUNG M, BEERENWINKEL N, *et al.* Clinicopathological and prognostic implications of genetic alterations in oral cancers. *Oncol Lett.* 2011;2:445-451
- PAVIA M, PILEGGI C, NOBILE CG, ANGELILLO IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1126-34.

- PAYEN, C., KOSZUL, R., DUJON, B, FISCHER, G. Segmental duplications arise from Pol32-dependent repair of broken forks through two alternative replication-based mechanisms. *PLoS Genet.* 4, e1000175 (2008).
- PEDRAM A, RAZANDI M, LEVIN ER. Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26722-8.
- PETER M, ROSTY C, COUTURIER J, *et al.* MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. ***Oncogene*** 2006; 25(44):5985-93. Epub 2006 May 8.
- PETER M, STRANSKY N, COUTURIER J, *et al.* Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. ***J. Pathol.*** 2010; 221:320-30.
- PETTUS JR, JOHNSON JJ, SHI Z, *et al.* Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Histol Histopathol.* 2009;24:197-207.
- PICARD V, BERGERON A, LARUE H, FRADET Y. MAGE-A9 mRNA and protein expression in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2007;120:2170-7.
- PIGNON JP, BOURHIS J, DOMENGE C, *et al.* Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet.* 2000;355:949-55.
- POLLACK JR. RNA common reference sets. In *DNA Microarrays: a molecular cloning manual.* Bowtell D & Sambrook J, eds. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, p.168-172, 2002.
- POSNER MR, HERSHOCK DM, BLAJMAN CR, *et al.* Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1705-15.
- POWERS CJ, MCLESKEY SW AND WELLSTEIN A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer.* 2000;7:165-97
- PRESTA M, DELL'ERA P, MITOLA S, *et al.* Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:159-78.
- PROIA NK, PASZKIEWICZ GM, NASCA MA, FRANKE GE, PAULY JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer—a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1061-77.
- PYEON D, NEWTON MA, LAMBERT PF, *et al.* Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res.* 2007;67:4605-19
- RAMAEKERS FC, HAAG D, KANT A, *et al.* Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2618-2622.
- RAMIREZ DE MOLINA A, GALLEGO-ORTEGA D, SARMENTERO J, *et al.* Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005;65:5647-53.

- RAMIREZ DE MOLINA A, PENALVA V, LUCAS L, LACAL JC. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene*. 2002a;21:937-46.
- RAMÍREZ DE MOLINA A, RODRIGUEZ-GONZALEZ A, GUTIERREZ R, *et al.* Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002b;296:580-83.
- RAMIREZ DE MOLINA A, SARMENTERO-ESTRADA J, BELDA-INIESTA C, *et al.* Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2007;8:889-97.
- RANTALA JK, EDGREN H, LEHTINEN L, *et al.* Integrative functional genomics analysis of sustained polyploidy phenotypes in breast cancer cells identifies an oncogenic profile for GINS2. *Neoplasia*. 2010 Nov;12(11):877-88.
- RAYBAUD H, FORTIN A, BAIRATI I, *et al.* Nuclear DNA content, an adjunct to p53 and Ki-67 as a marker of resistance to radiation therapy in oral cavity and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000;29:36-41.
- RAYBAUD-DIOGÈNE H, FORTIN A, MORENCY R, *et al.* Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Clin Oncol.* 1997;15:1030-8.
- REIS EM, NAKAYA HI, LOURO R, *et al.* Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*, 23(39):6684-6692, 2004.
- RICHARDS KL, ZHANG B, BAGGERLY KA, *et al.* Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One* 2009;4:e4941.
- ROMANO M, CATALANO A, NUTINI M, *et al.* 5-Lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J.* 2001;15:2326-36.
- ROSE AE, POLISENO L, WANG J, *et al.* Integrative genomics identifies molecular alterations that challenge the linear model of melanoma progression. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2561-71.
- ROSENTHAL EL, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:639-48.
- ROZ L, WU CL, PORTER S, *et al.* Allelic imbalance on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: an early event in oral carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996:1228-31.
- SANCHEZ-GARCIA F, AKAVIA UD, MOZES E, PE'ER D. JISTIC: identification of significant targets in cancer. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:189.
- SCHEETZ FJ, LLOYD PJ. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn.* 2000;218:235-259.
- SCHILSKY RL. Biochemical pharmacology of chemotherapeutic drugs used as radiation enhancers. *Semin Oncol.* 1992;19(4 Suppl 11):2-7.

- SCHWARTZ GK, SHAH MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:9408-21.
- SELBACH M, SCHWANHAUSSER B, THIERFELDER N, *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;455:58–63.
- SHAO L. *et al.* Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am. J. Med. Genet. A* 146A, 2242–2251 (2008).
- SHARMA R, AHUJA M, PANDA NK, KHULLAR M. Combined effect of smoking and polymorphisms in tobacco carcinogen-metabolizing enzymes CYP1A1 and GSTM1 on the head and neck cancer risk in North Indians. *DNA Cell Biol.* 2010 Aug;29(8):441-8.
- SHE X. *et al.* The structure and evolution of centromeric transition regions within the human genome. *Nature* 430, 857–864 (2004).
- SHIFMAN S, LEVIT A, CHEN ML, *et al.* A complete genetic association scan of the 22q11 deletion region and functional evidence reveal an association between DGCR2 and schizophrenia. *Hum. Genet.* 2006;120:160-70.
- SHIMONO Y, ZABALA M, CHO RW, *et al.* Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell.* 2009;138:592–603.
- SINGH NP, MADABHUSHI SR, SRIVASTAVA S, *et al.* Epigenetic profile of the euchromatic region of human Y chromosome. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(9):3594-606.
- SKALETSKY H, KURODA-KAWAGUCHI T, MINX PJ, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003;423:825–837.
- SLEBOS RJ, YI Y, ELY K, *et al.* Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):701-9.
- SLEBOS RJ, YI Y, ELY K, *et al.* Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006;12:701-9.
- SMEETS SJ, BRAAKHUIS BJ, ABBAS S, *et al.* Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* 2006;25:2558–64.
- SMEETS SJ, BRAKENHOFF RH, YLSTRA B, *et al.* Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with ha different prognosis. *Cellular Oncology.* 2009;31:291-300.
- SMITH IM, MITHANI SK, LIU C, *et al.* Novel integrative methods for gene discovery associated with head and neck squamous cell carcinoma development. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 135:487-95.
- SMITH, RB, SNIEZEK JC, WEED DT *et al.* Utilization of free tissue transfer in head and neck surgery. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 137, 182–191 (2007).
- SOMOZA-MARTÍN JM, GARCÍA-GARCÍA A, BARROS-ANGUEIRA F, *et al.* Gene Expression Profile in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Pilot Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005;63:786-92.

- SONESON C, LILLJEBJORN H, FIORETOS T, FONTES M. Integrative analysis of gene expression and copy number alterations using canonical correlation analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11:191.
- SPANOS WC, NOWICKI P, LEE DW *et al*. “Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer,” *Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, vol. 135, no. 11, pp. 1137–1146, 2009.
- SPARANO A, QUESNELLE KM, KUMAR MS, *et al*. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *Laryngoscope*. 2006;116(5):735-41.
- STANKIEWICZ P. *et al*. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1101–1116 (2003).
- STEINERT PM, ROOP DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* 1988;57:593–625.
- STOKES A, JOUTSA J, ALA-AHO R, *et al*. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2010;16:2022-35.
- STOLF BS, SANTOS MM, SIMAO DF, *et al*. Class distinction between follicular adenomas and follicular carcinomas of the thyroid gland on the basis of their signature expression. *Cancer* 2006; 106:1891-900.
- STRAUSS MJ e SHAW EW. “Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies,” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 72, no. 1, pp. 46–50, 1949.
- STURGIS EM, WEI Q. Genetic susceptibility—molecular epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 310–17.
- SUGIMOTO T, SEKI N, SHIMIZU S, *et al*. The galanin signaling cascade is a candidate pathway regulating oncogenesis in human squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:132-42.
- TANAKA H, YAO MC. Palindromic gene amplification — an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome. *Nature Rev. Cancer* 9, 216–224 (2009).
- TEWS B, FELSBURG J, HARTMANN C, *et al*. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int. J. Cancer*. 2006;119:792–800.
- THIERY JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:740–746.
- THOMAS GT, LEWIS MP, SPEIGHT PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999;35:227–33.
- THORLAND EC, MYERS SL, PERSING DH, *et al*. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.* 2000;60:5916-21.
- TREJTER M, BRELINSKA R, WARCHOL JB, *et al*. Effects of galanin on proliferation and apoptosis of immature rat thymocytes. *Int. J. Mol. Med.* 2002;10:183–6.

- TRIBIUS S, IHLOFF A, RIECKMANN T, PETERSEN C, HOFFMAN M. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: What we know and what we need to know. *Cancer Lett.* 2011; 304: 71-9.
- TSUI IFL, GARNIS C. Integrative molecular characterization of head and neck cancer cell model genomes. *Head Neck.* 2010; 32:1143-1160.
- TURNER N, GROSE R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2010;10:116-29.
- TUYNS AJ, ESTEVE J, RAYMOND L, *et al.* Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 1988; 41: 483-91.
- UNDERWOOD KW, SONG C, KRIZ RW, *et al.* A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2- β , that is prenylated and contains homology to cPLA2. *J. Biol. Chem.* 1998;273:21926-32.
- VAAMONDE P, MARTÍN C, DEL RÍO M, *et al.* Second primary malignancies in patients with cancer of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(1):65-70.
- VALASTYAN S, WEINBERG RA. MicroRNAs: crucial multi-tasking components in the complex circuitry of tumor metastasis. *Cell Cycle.* 2009;8:3506-12.
- Vallejo DM, Caparros E, Dominguez M. Targeting notch signalling by the conserved mir-8/200 microRNA family in development and cancer cells. *EMBO J.* 2011;30:756-69.
- VAN DEN BROEK GB, WILDEMAN M, RASCH CN, *et al.* Molecular markers predict outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck after concomitant cisplatin-based chemoradiation. *Int. J. Cancer.* 2009;124:2643-50.
- VAN DEN BROEK GB, WREESMANN VB, VAN DEN BREKEL MWM, *et al.* Genetic Abnormalities Associated with Chemoradiation Resistance of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:4386-91.
- VAN MONSJOU HS, BALM AJ, VAN DEN BREKEL MM, WREESMANN VB. Oropharyngealsquamous cell carcinoma: a unique disease on the rise? *Oral Oncol.* 2010Nov;46(11):780-5.
- VERGEER MR *et al.* Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 1-8 (2009).
- VERMORKEN JB, REMENAR E, VAN HERPEN C, *et al.* Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1695-704.
- VINEIS P, ALAVANJA M, BUFFIER P, *et al.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 99-106.
- VISSER R *et al.* Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 52-67 (2005).

- VOORHOEVE PM, LE SAGE C, SCHRIER M, *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell.* 2006;124:1169-81.
- WANG D *et al.* Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis* 18, 2285–2290 (1997).
- WARNAKULASURIYA S. Areca nut use following migration and its consequences. *Addict Biol* 2002; 7: 127–32.
- WEINBERG PM, YU Z, HAFPTY BG, *et al.* Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol.* 2006;24:736-47.
- WEISS MH. Head and neck cancer and the quality of life. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;108:311-2.
- WELLNER U, SCHUBERT J, BURK UC, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1487–95.
- WENTZENSEN N, VINOKUROVA S, DOEBERITZMVK. Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract. *Cancer Res* 64, 3878 –3884, 2004.
- WERNER JA, RATHCKE IO, MANDIC R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Exp. Metastasis.* 2002;19:275–82.
- WESCHE J, HAGLUND K, HAUGSTEN EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J.* 2011;437:199-213.
- WESTRA WH, TAUBE JM, POETA ML *et al.* Inverse Relationship between Human Papillomavirus-16 Infection and Disruptive p53 Gene Mutations in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res* 2008;14:366-9.
- WILKE CM, HALL BK, HOGE A, *et al.* FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5:187-95.
- WREESMANN VB, SHI W, THALER HT, *et al.* Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:3965-72.
- WU B-H, XIONG X-P, JIA J, ZHANG W-F. MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol.* 2011;47:314–9.
- XIE X, DE ANGELIS P, CLAUSEN OPF, *et al.* Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral oncol.* 1999;35:502-9.
- XU C, LIUY, WANG P, *et al.* Integrative analysis of DNA copy number and gene expression in metastatic oral squamous cell carcinoma identifies genes associated with poor survival. *Mol Cancer.* 2010; 9:143.
- YAMAZAKI Y, CHIBA I, HIRAI A, *et al.* Radioresistance in oral squamous cell carcinoma with p53 DNA contact mutation. *Am J Clin Oncol.* 2003;26:e124-9.

- YAN GR, XU SH, TAN ZL, *et al.* Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics*. 2011;11:912–20.
- YANG K, HANDOREAN AM, ICZKOWSKI KA. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2009;2:361-9.
- YAO J, WEREMOWICZ S, FENG B, *et al.* Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res.* 2006;66:4065–78.
- YATSENKO, SA. *et al.* Molecular mechanisms for subtelomeric rearrangements associated with the 9q34.3 microdeletion syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1924–1936 (2009).
- YUAN Z, SUN X, LIU H, XIE J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. *PLoS One.* 2011;6:e17666.
- YUEYING W, JIANBO W, HAILIN L, *et al.* ECRG1, a novel esophageal gene, cloned and identified from human esophagus and its inhibition effect on tumors. *Carcinogenesis.* 2008;29:157-60.
- ZAVADIL J, YE H, LIU Z, *et al.* Profiling and functional analyses of microRNAs and their target gene products in human uterine leiomyomas. *PLoS One.* 2010 Aug 24;5(8):e12362.
- ZHANG Q, MENG Y, ZHANG L, *et al.* RNF13: a novel RING-type ubiquitin ligase over-expressed in pancreatic cancer. *Cell Research.* 2009;19:348-357.
- ZHANG L, LU HH, CHUNG WY, *et al.* Patterns of segmental duplication in the human genome. *Mol. Biol. Evol.* 22, 135–141 (2005).
- ZHAO N. *et al.* Induction of G1 cell cycle arrest and P15INK4b expression by ECRG1 through interaction with Miz-1. *J. Cell. Biochem.* 2004;92: 65-76.
- ZHENG M, SIMON R, MIRLACHER M, *et al.* TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Am J Pathol.* 2004;165:63-9.
- ZHENG ZM, WANG X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011 [epub ahead of print].

Suplementos

SUPLEMENTOS

Tabela Suplementar 1. Questionários de qualidade de vida da Universidade de Washington e Inventário de Sintomas traduzido do M.D. Anderson (MDASI).

Amostra	Questionário de Qualidade de Vida (Universidade de Washington)	Inventário de Sintomas do M.D. Anderson (MDASI)
FAR1T	-	-
FAR2T	89	1
FAR3T	-	-
FAR4T	79	1
FAR5T	-	-
FAR6T	84	1
FAR7T	61	1
FAR8T	83	1
FAR9T	90	0
FAR10T	95	1
FAR11T	55	4
FAR12T	73	3
FAR15T	65	2
FAR17T	85	2
837868	-	-
937501	-	-
1000030	100	0
1013417	93	0
1026835	87	1
1023767	48	6
1025827	74	1
1025726	84	0
1001633	75	1
1039532	42	6
1102747	95	0
1009242	-	-

(-): Pacientes que vieram à óbito.

Tabela Suplementar 2. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 32 pacientes com carcinoma de orofaringe.

Cromossomo 1	Início	Final	Tamanho (pb)	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)	Casos
p36.33 - p36.32	0	2,561,504	2561504	Ganho	90	5	21,9	1025726; FAR6T; O_04; O_07; O_08; O_12; FAR17T; 1039532
p36.32	2,561,504	3,392,755	831251	Perda	4	0	21,9	FAR15T; O_02; O_13; 1013417; 1025827; 1026835; 1102747; 1025726
p31.3	62,321,931	62,462,574	140643	Perda	2	0	21,9	FAR4T; FAR15T; O_02; O_10; 1023767; 1025827; 1102747 (*)
p31.1	71,240,252	75,129,356	3889104	Perda	10	1	21,9	FAR4T; FAR6T; FAR15T; O_02; O_10; O_14; 1023767; FAR7T; O_07; 1025726
p21.3 - p13.1	99,002,102	115,944,559	16942457	Perda	144	2	21,9	FAR4T; FAR15T; O_02; 1023767; O_05; O_07; O_08; O_10; O_14; 1025726; 1039532
p13.1 - p11.2	117,592,241	121,023,900	3431659	Perda	22	0	21,9	1013417; 1023767; 1025726; FAR15T; 1039532; 1102747 (*)
q21.1 - q25.1	143,794,981	172,599,921	28804940	Ganho	536	13	21,9	FAR12T; 1025726; 1026835; FAR4T; FAR6T; FAR7T; FAR11T; FAR15T; FAR17T; O_04; O_08; O_13; 1013417; O_05; 1025827; 1039532
q25.2 - q31.1	174,719,041	188,776,630	14057589	Ganho	68	1	21,9	FAR4T; FAR12T; FAR15T; O_12; O_13; 1026835; O_04; 1013417; 1025827
q32.1 - q32.2	197,964,249	208,104,840	10140591	Ganho	133	5	21,9	FAR4T; FAR12T; FAR15T; O_12; 1025827; FAR11T; O_04; O_08; 1013417; 1025726 1039532
q32.3	209,914,303	210,938,888	1024585	Ganho	11	0	21,9	FAR4T; FAR12T; FAR15T; FAR17T; O_04; O_08; O_12 (*)
q41 - q44	216,605,953	247,249,719	30643766	Ganho	231	6	21,9	FAR12T; FAR15T; O_12; 1025726; FAR4T; FAR6T; FAR7T; FAR8T; FAR11T; O_02; O_05; O_08; O_10; O_04; O_14; 1013417; 1025827
Cromossomo 2								
p14	64,703,678	65,083,911	380233	Ganho	2	0	21,9	FAR15T; FAR17T; O_04; O_05; 1013417; 1025827; 1026835 (*)
q22.1	141,137,348	141,769,424	632076	Perda	1	0	21,9	O_04; O_12; O_14; FAR1T; 1023767; 1025726; FAR4T; FAR6T; O_07; O_10; O_13
q31.1 - q31.2	171,488,247	178,950,282	7462035	Ganho	52	3	21,9	O_01; O_13; 1013417; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; O_14 (*)
q32.1 - q33.1	187,554,607	197,602,912	10048305	Ganho	39	2	21,9	O_02; O_13; 1013417; 1023767; 1025726; 1026835; O_01; 1025827; 1102747
q34 - q35	211,237,979	220,044,520	8806541	Perda	75	4	21,9	O_13; O_14; 1023767; 1025726; 1039532; O_02; O_04; 1025827
q36.1 - q36.3	221,995,157	230,537,559	8542402	Perda	33	0	21,9	O_02; O_13; O_14; 1023767; 1025726; 1025827; 1039532 (*)
q37.1	232,534,827	234,663,161	2128334	Perda	37	1	21,9	O_02; O_13; O_14; 1023767; 1025726; 1025827; 1039532; FAR8T
q37.2	236,155,944	236,707,794	551850	Perda	1	0	21,9	O_02; O_13; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532 (*)
q37.3	238,988,574	240,458,444	1469870	Perda	3	0	21,9	O_02; O_13; O_14; 1023767; 1025726; 1025827; 1039532 (*)
Cromossomo 3								
p26.3 - p11.1	0	90,364,805	90364805	Perda	527	14	37,5 (**)	FAR4T; FAR15T; O_07; O_12; FAR1T; 1023767; 1025726; FAR2T; FAR3T; FAR5T; FAR6T; FAR8T; FAR12T; FAR17T; O_02; O_04; O_05; O_08; O_10; O_13; O_14; 1013417; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747

q11.2 - q29	95,034,308	199,501,827	104467519	Ganho	616	17	25,0	1023767; FAR6T; FAR1T; 1025726; FAR2T; FAR4T; FAR5T; FAR7T; FAR9T; FAR11T; FAR15T; FAR17T; O_01; O_02; O_04; O_05; O_07; O_08; O_10; O_11; O_12; O_13; O_14; 1013417; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747
-------------	------------	-------------	-----------	-------	-----	----	------	--

Cromossomo 4

p16.3 - p12	0	46,776,244	46776244	Perda	228	9	21,9	FAR15T; O_02; O_12; 1023767; 5-FAR5T; FAR6T; FAR8T; 9-FAR9T; FAR11T; FAR12T; O_04; O_05; O_07; FAR17T; O_10; 1013417; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747
q12 - q13.2	58,030,230	67,990,488	9960258	Perda	3	1	21,9	FAR1T; O_04; 1023767; FAR6T; FAR11T; FAR15T; O_02; O_05; O_08; O_14; 1026835; 1025827
q13.3	72,374,391	73,377,729	1003338	Perda	4	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1025827; 1039532 (*)
q21.21	80,120,410	82,324,320	2203910	Perda	9	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_04; O_14; 1023767; FAR11T; 1025726
q21.22 - q21.3	84,127,730	87,522,053	3394323	Perda	15	0	21,9	FAR1T; FAR5T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1025726; O_05
q22.1	89,842,259	90,064,965	222706	Perda	3	0	21,9	FAR1T; FAR5T; FAR15T; O_02; 1023767; 1025726; 1025827 (*)
q22.1 - q23	91,056,991	99,236,503	8179512	Perda	12	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; 1023767; 1025726; FAR4T; FAR5T; FAR6T; FAR11T; O_04; O_07; O_12; O_13; O_05; O_14
q26	115,517,289	118,999,533	3482244	Perda	5	2	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1025726; FAR11T; O_04
q27 - q28.3	123,253,674	139,180,116	15926442	Perda	27	1	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; 1023767; 1025726; FAR6T; FAR11T; O_04; O_08; O_14; 1039532; 1025827
q31.21	142,114,960	143,374,449	1259489	Perda	4	0	21,9	FAR1T; FAR11T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1025726 (*)
q31.22 - q31.23	147,451,904	148,284,039	832135	Perda	3	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_04; O_14; 1023767; 1025726 (*)
q31.23 - q31.3	150,366,566	152,200,818	1834252	Perda	3	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_04; O_14; 1023767; 1025726 (*)
q31.3 - q32.1	153,112,736	158,823,785	5711049	Perda	31	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1102747; FAR4T; FAR6T; FAR11T; O_04; 1025827; 1025726
q32.1 - q32.3	160,515,794	165,493,316	4977522	Perda	8	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_04; O_14; 1023767; FAR6T; FAR11T; 1102747
q32.3	168,075,281	168,732,969	657688	Perda	1	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_04; O_14; 1023767; 1025726 (*)
q32.3	169,862,480	170,061,099	198619	Perda	1	0	21,9	FAR1T; FAR15T; FAR17T; O_02; O_14; 1023767; 1025726 (*)
q33 - q35.1	171,188,900	183,879,735	12690835	Perda	27	1	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1025726; FAR5T; FAR11T; O_04; 1025827
q35.2	187,882,711	191,273,063	3390352	Perda	44	0	21,9	FAR1T; FAR15T; O_02; O_14; 1023767; 1025726; FAR4T; FAR6T; FAR11T; 1013417 1025827

Cromossomo 5

p15.33 - p11	0	46,136,124	46136124	Ganho	154	4	25,0	1023767; FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_04; O_07; O_13; 1025726; FAR9T; FAR17T; O_01; O_02; O_05; O_10; O_11; O_12; O_14; 1013417; 1025827; 1026835; 1039532
q11.1 - q11.2	50,071,199	51,436,445	1365246	Perda	2	0	21,9	FAR5T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; O_14; 1025726 (*)
q11.2	58,274,030	58,543,928	269898	Perda	1	0	21,9	FAR5T; FAR15T; FAR17T; O_02; O_04; O_07; 1025726 (*)
q11.2	58,584,609	58,854,317	269708	Perda	1	0	21,9	FAR5T; FAR15T; FAR17T; O_02; O_04; O_07; O_12 (*)
q12.1 - q13.2	59,196,179	68,885,409	9689230	Perda	45	0	21,9	FAR5T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; 1025726; FAR8T; 1023767
q13.2	70,345,552	73,097,955	2752403	Perda	25	0	21,9	FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; 1023767; 1025726; O_07

q13.3 - q23.2	74,096,777	121,764,622	47667845	Perda	166	6	21,9	FAR5T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; 1025726; FAR1T; FAR6T; FAR8T; FAR11T 1023767
q23.2	122,997,726	124,963,021	1965295	Perda	1	0	21,9	FAR5T; FAR11T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; 1025726 (*)
q23.2 - q23.3	126,385,879	130,141,505	3755626	Perda	12	0	21,9	FAR5T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; 1025726; FAR1T; FAR6T; FAR11T
q31.1	130,609,566	130,966,236	356670	Perda	2	0	21,9	FAR5T; FAR15T; FAR17T; O_02; O_04; O_07; 1025726 (*)
q31.1	131,143,495	134,625,563	3482068	Perda	45	1	21,9	FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; 1025726; FAR1T; O_07; 1026835
q31.2	135,642,397	137,237,681	1595284	Perda	7	1	21,9	FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; 1025726; 1026835; FAR5T; FAR6T
q31.3	140,076,056	140,845,839	769783	Perda	60	0	21,9	FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; 1013417; 1025726 (*)
q31.3	142,069,945	142,222,744	152799	Perda	1	0	21,9	FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; 1025726 (*)
q32 - q33.1	143,547,871	149,097,971	5550100	Perda	38	4	21,9	FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; O_07; 1025726; FAR1T
q33.1 - q35.3	150,607,685	180,857,866	30250181	Perda	217	10	21,9	FAR5T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; O_07

Cromossomo 6

p25.3	0	205,744	205744	Ganho	0	0	21,9	FAR8T; FAR17T; O_08; 1013417; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
p25.2	2,733,258	2,946,305	213047	Ganho	5	0	21,9	FAR8T; FAR17T; O_08; 1013417; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
p23	14,434,510	15,222,593	788083	Ganho	0	0	21,9	FAR6T; FAR8T; FAR17T; O_08; 1013417; 1025827; 1102747 (*)
p22.2 - p22.1	26,063,410	27,250,904	1187494	Ganho	53	0	21,9	FAR6T; FAR8T; O_08; 1013417; 1025827; 1039532; 1102747; 1025726; 1026835
p22.1	27,883,565	28,001,754	118189	Ganho	17	0	21,9	FAR6T; O_08; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747; FAR8T
p21.1	41,611,649	42,573,044	961395	Ganho	17	0	21,9	FAR6T; FAR8T; O_08; O_14; 1025827; 1039532; O_10; 1013417
p21.1	43,892,008	44,350,778	458770	Ganho	10	0	21,9	FAR6T; FAR8T; O_08; O_10; O_14; 1025827; 1039532 (*)
p21.1 - p12.3	44,455,944	45,572,329	1116385	Ganho	4	1	21,9	FAR8T; O_08; 1013417; 1025827; 1026835; 1039532; O_10; O_14
q16.1	92,701,753	97,296,400	4594647	Perda	6	0	21,9	FAR1T; O_04; O_05; 1025827; 1026835; 1039532; FAR11T; O_14
q24.3	145,907,686	146,694,399	786713	Perda	4	0	21,9	FAR1T; FAR11T; O_04; O_05; O_12; 1039532; 1102747 (*)
q26	163,085,335	163,202,814	117479	Perda	1	0	21,9	FAR1T; FAR17T; O_04; O_13; O_14; 1026835; 1039532 (*)

Cromossomo 7

p22.3 - p22.2	254,292	3,128,244	2873952	Ganho	36	1	21,9	FAR5T; FAR15T; O_07; O_08; O_11; O_04; O_10; O_13; 1026835
p22.2 - p22.1	4,316,569	6,785,715	2469146	Ganho	38	1	21,9	FAR15T; O_05; O_07; O_11; O_13; O_04; O_10; 1026835 FAR15T; O_07; O_11; O_13; 1026835; O_04; O_05; 1013417; 1023767; 1025726 1025827
p21.3 - p15.1	11,023,940	30,700,943	19677003	Ganho	103	5	21,9	1025726; FAR15T; O_07; O_11; O_13; FAR17T; O_05; 1026835
p14.2 - p14.1	35,932,733	39,862,475	3929742	Ganho	20	1	21,9	FAR15T; O_05; O_07; O_11; O_13; FAR5T; O_04; 1026835
p14.1 - p12.3	40,800,779	47,953,877	7153098	Ganho	54	0	21,9	FAR11T; FAR15T; O_02; O_13; 1013417; 1039532; FAR17T; O_08; 1025827
q11.23 - q21.11	76,231,307	78,076,184	1844877	Ganho	11	0	21,9	FAR15T; O_02; O_13; 1013417; 1025726; 1039532; FAR11T; O_05; 1025827

q21.12	86,251,335	86,339,564	88229	Ganho	1	0	21,9	FAR11T; FAR15T; O_04; O_13; 1013417; 1025726; 1039532 (*)
q21.13 - q31.1	88,584,576	110,465,752	21881176	Ganho	212	8	21,9	FAR15T; O_13; 1025827; FAR11T; FAR17T; O_02; O_04; O_08; O_10; 1013417; 1025726; 1026835; 1039532; 1023767
q31.1	110,861,896	112,252,603	1390707	Ganho	7	0	21,9	1025726; O_08; O_10; O_13; 1023767; FAR11T; FAR15T; O_02; 1013417
q31.33	125,217,218	125,369,394	152176	Perda	0	0	21,9	FAR15T; O_02; O_08; O_10; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
q31.33	126,511,530	126,676,202	164672	Perda	1	0	21,9	FAR15T; O_08; O_10; 1025726; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
q32.1 - q32.3	127,332,722	130,133,989	2801267	Perda	48	6	21,9	FAR15T; O_08; O_10; 1013417; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
q32.3	130,456,147	132,081,204	1625057	Perda	3	0	21,9	FAR15T; O_08; O_10; 1013417; 1025827; 1039532; 1102747; 1026835
q33 - q34	135,322,723	138,177,309	2854586	Perda	11	1	21,9	FAR15T; O_08; O_10; 1023767; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
q34 - q36.3	141,313,263	158,821,424	17508161	Perda	149	5	21,9	FAR15T; 1025827; 1102747; FAR6T; FAR8T; O_05; O_08; O_10; 1013417; 1023767; 1026835; 1039532; 1025726

Cromossomo 8

p23.3 - p12	0	36,063,037	36063037	Perda	250	9	21,9	FAR5T; O_07; FAR1T; 1025726; FAR4T; FAR8T; FAR11T; FAR15T; O_04; O_05; O_08; O_10; O_12; O_13; O_14; 1013417; 1025827; 1026835; 1102747
p12	33,411,266	33,473,449	62183	Ganho	2	0	21,9	FAR1T; 1023767; FAR4T; FAR6T; FAR15T; O_02; 1013417 (*)
p12 - p11.1	35,596,526	43,515,933	7919407	Ganho	62	1	21,9	FAR1T; FAR6T; FAR3T; FAR4T; FAR8T; FAR12T; FAR15T; O_02; O_04; O_05; O_08; O_11; O_12; O_07; O_13; 1013417; 1025827; 1026835
q11.1 - q24.3	47,062,622	146,274,826	99212204	Ganho	452	21	40,6 (**)	FAR1T; 1023767; O_02; O_10; O_12; O_14; 1025726; FAR4T; FAR5T; FAR6T; FAR8T; FAR9T; FAR10T; FAR11T; FAR17T; O_01; O_04; O_05; O_07; O_08; O_13; 1026835; 1013417; 1025827; 1039532; 1102747

Cromossomo 9

p24.3 - p13.1	0	39,146,954	39146954	Perda	224	6	34,4 (**)	1023767; 1025726; FAR4T; FAR5T; O_05; O_07; O_10; O_12; FAR2T; FAR8T; FAR15T; O_02; O_04; O_08; O_13; O_14; 1039532; 1013417; 1025827; 1026835
q13 - q21.11	70,174,301	71,472,888	1298587	Perda	9	0	21,9	FAR8T; O_02; O_05; O_07; 1025726; 1025827; 1026835 (*)
q21.11 - q21.13	72,227,208	73,511,180	1283972	Perda	3	1	21,9	FAR8T; O_02; O_05; O_07; 1025726; 1025827; 1026835 (*)
q21.13 - q21.31	75,255,765	83,274,533	8018768	Perda	20	0	21,9	FAR8T; FAR11T; O_02; O_05; O_07; 1025827; 1025726; 1026835
q21.32	83,515,747	85,021,244	1505497	Perda	5	0	21,9	FAR8T; FAR11T; O_02; O_05; O_07; 1025827; 1026835 (*)
q21.33 - q22.1	89,162,039	89,905,566	743527	Perda	7	0	21,9	FAR8T; O_02; O_05; O_07; 1013417; 1025827; 1102747 (*)
q31.2 - q31.3	109,428,623	110,835,752	1407129	Ganho	6	0	21,9	FAR2T; FAR5T; O_08; O_14; 1025827; 1102747; FAR6T; O_02; 1039532 ;
q34.11	129,852,248	130,050,048	197800	Ganho	10	1	21,9	FAR5T; FAR6T; FAR9T; O_08; O_10; O_14; 1025726 (*)
q34.3	137,916,641	139,519,555	1602914	Ganho	77	1	21,9	FAR5T; FAR6T; FAR17T; O_08; O_10; O_14; 1025726; O_04

Cromossomo 10

p15.2 - p15.1	3,298,443	6,435,794	3137351	Ganho	24	0	21,9	O_02; O_05; O_07; O_08; O_14; 1039532; O_10; 1013417; 1025827
p11.21 - p11.1	35,889,918	39,116,597	3226679	Perda	12	0	21,9	FAR4T; FAR12T; FAR15T; O_13; 1013417; 1025726; 1039532 (*)
q23.1	83,872,824	85,263,486	1390662	Perda	1	0	21,9	FAR5T; FAR6T; FAR12T; O_14; 1013417; 1025726; 1026835 (*)

q25.1	106,845,484	107,129,929	284445	Perda	1	0	21,9	1025726; FAR5T; FAR12T; FAR17T; O_12; O_14; 1026835 (*)
q25.3	116,853,636	117,464,114	610478	Perda	1	0	21,9	1025726; FAR5T; FAR12T; O_04; O_12; O_14; 1026835 (*)
q25.3 - q26.11	117,776,526	120,371,973	2595447	Perda	19	0	21,9	FAR5T; FAR12T; O_12; O_14; 1013417; 1025726; 1026835 (*)
q26.11 - q26.12	121,482,784	122,690,501	1207717	Perda	6	0	21,9	FAR5T; FAR12T; O_12; O_14; 1013417; 1025726; 1026835 (*)
q26.3	130,957,443	131,487,038	529595	Perda	1	0	21,9	FAR5T; FAR12T; FAR17T; O_12; O_14; 1013417; 1026835 (*)
q26.3	131,588,593	132,852,430	1263837	Perda	3	0	21,9	FAR5T; FAR12T; O_12; 1013417; 1026835; 1102747; O_14; 1025726

Cromossomo 11

p15.5 - p15.4	0	3,329,448	3329448	Perda	100	3	21,9	O_07; O_12; 1013417; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; FAR4T; FAR8T; FAR12T 1102747
p15.4	3,346,699	8,499,461	5152762	Perda	129	1	21,9	FAR5T; O_07; O_12; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; FAR6T; FAR11T; O_14
p15.4 - p15.3	10,678,053	11,215,712	537659	Perda	4	0	21,9	FAR15T; O_07; O_12; O_14; 1025726; 1025827; 1039532 (*)
p15.1 - p14.3	20,969,083	25,035,896	4066813	Perda	7	0	21,9	O_04; O_07; O_14; 1025827; 1026835; 1039532; FAR5T; FAR11T; O_08; O_12
p14.1	28,931,910	29,625,975	694065	Perda	0	0	21,9	FAR5T; FAR11T; O_07; O_14; 1025827; 1026835; 1039532 (*)
p14.1 - p13	30,949,136	31,765,442	816306	Perda	5	0	21,9	FAR5T; O_04; O_07; O_14; 1025827; 1026835; 1039532 (*)
p12	36,595,920	40,180,361	3584441	Perda	2	0	21,9	FAR5T; O_04; O_07; O_14; 1025827; 1026835; 1039532 (*)
q13.1 - q13.4	63,689,674	71,134,394	7444720	Ganho	190	5	21,9	O_08; O_10; 1025827; 1026835; FAR4T; FAR5T; FAR7T; FAR10T; O_04; O_05; O_12; 1013417; 1023767; O_07; 1025726; 1039532
q13.4	71,678,545	71,735,298	56753	Ganho	1	0	21,9	FAR5T; O_04; O_05; O_10; 1023767; 1025827; 1026835 (*)
q13.4 - q25	72,684,187	134,452,384	61768197	Perda	435	10	21,9	1025726; 1025827; FAR1T; FAR4T; FAR5T; FAR6T; FAR11T; FAR12T; O_04; O_05; O_08; O_10; O_11; O_07; O_12; O_14; 1013417; 1023767; 1026835

Cromossomo 12

p13.33	0	1,799,390	1799390	Ganho	16	0	21,9	FAR1T; FAR6T; O_01; O_05; 1025726; 1025827; 1026835; O_04
p13.33 - p13.32	2,517,209	3,682,552	1165343	Ganho	11	0	21,9	FAR6T; O_01; O_04; O_05; O_08; O_14; 1025827 (*)
p13.31	5,919,696	7,674,348	1754652	Ganho	58	2	21,9	FAR1T; FAR6T; O_01; O_05; 1025827; O_04; O_08; O_10; 1025726; 1026835
p13.31 - p13.2	9,150,296	10,826,157	1675861	Ganho	31	1	21,9	FAR1T; FAR6T; O_01; O_05; 1025827; 1026835; O_02; O_12; 1013417; 1102747
p13.2 - p13.1	12,363,395	13,267,588	904193	Ganho	19	2	21,9	FAR1T; FAR6T; O_01; O_05; 1013417; 1025827; 1026835 (*)
p13.1 - p12.3	14,297,095	15,922,373	1625278	Ganho	16	0	21,9	FAR1T; FAR6T; O_01; O_05; 1013417; 1025726; 1026835 (*)
p12.3 - p11.21	17,239,361	31,747,747	14508386	Ganho	68	1	21,9	FAR1T; O_05; 1025726; 1026835; FAR6T; O_01; O_04; O_12; O_14; 1013417 1025827
p11.21	32,302,644	32,820,054	517410	Ganho	4	0	21,9	FAR1T; FAR6T; O_05; O_14; 1025726; 1025827; 1026835 (*)
q13.13 - q13.2	52,618,085	53,146,122	528037	Ganho	27	3	21,9	FAR1T; O_04; O_08; O_14; 1025726; 1025827; 1039532 (*)
q13.2	54,342,720	55,127,097	784377	Ganho	38	0	21,9	FAR1T; O_04; O_14; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; O_08
q13.3	55,608,918	55,930,784	321866	Ganho	15	1	21,9	FAR1T; O_04; O_08; O_14; 1025726; 1025827; 1039532; O_10
q24.33	129,932,472	130,745,909	813437	Perda	2	0	21,9	FAR4T; 1013417; 1023767; 1025726; 1026835; 1039532; 1102747 (*)

q24.33	131,561,517	132,126,792	565275	Perda	11	0	21,9	FAR4T; O_10; 1013417; 1023767; 1026835; 1039532; 1102747 (*)
Cromossomo 13								
q11 - q22.1	18,194,544	72,589,725	54395181	Perda	263	5	21,9	FAR5T; O_02; O_05; 1039532; 1102747; FAR4T; FAR6T; FAR11T; FAR12T; FAR17T; O_08; O_12; O_13; O_04; 1013417; 1025827; 1026835;
q22.1 - q32.1	73,275,267	96,366,876	23091609	Perda	45	7	21,9	FAR4T; FAR5T; O_02; O_05; 1039532; 1102747; FAR1T; FAR6T; FAR12T; O_04 1025827
q32.2 - q34	97,426,391	114,142,980	16716589	Perda	75	2	21,9	FAR4T; FAR5T; O_05; 1025726; 1039532; 1102747; FAR6T; FAR17T; O_02; 1013417 1025827
Cromossomo 14								
q32.2 - q32.31	100,065,156	101,214,731	1149575	Perda	100	52	21,9	FAR2T; FAR12T; FAR15T; 1025726; 1025827; 1102747; 1013417; 1026835
q32.33	103,487,321	106,368,585	2881264	Perda	32	1	25,0	FAR2T; FAR12T; FAR15T; 1025726; 1025827; 1026835; 1102747; FAR8T; FAR10T; FAR11T; O_14; 1013417; FAR17T
Cromossomo 15								
q11.1 - q13.1	18,362,555	27,450,036	9087481	Perda	169	1	21,9	FAR5T; O_02; 1025726; 1025827; 1026835; FAR1T; FAR2T; FAR4T; FAR6T; FAR8T; FAR12T; O_01; O_04; FAR10T; O_05; O_07; O_08; O_10; O_11; O_12; O_13; O_14; 1013417; 1023767; 1039532; 1102747
Cromossomo 16								
q12.2 - q13	52,699,931	55,428,112	2728181	Ganho	34	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_04; O_05; 1013417; 1025827; 1026835 (*)
q21 - q23.1	64,968,058	74,229,163	9261105	Ganho	158	4	21,9	FAR4T; FAR5T; O_04; O_05; 1025827; FAR1T; O_02; O_07; O_08; O_10; 1013417; 1025726; 1039532; O_13
q23.1 - q23.3	77,585,298	81,455,868	3870570	Ganho	20	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_05; O_10; 1013417; 1026835; O_02; O_04; O_14 ;
q23.3 - q24.1	82,227,683	82,825,518	597835	Ganho	12	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_02; O_04; O_05; O_10; 1026835 (*)
q24.2	85,675,282	85,981,966	306684	Ganho	1	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_02; O_04; O_05; O_08; O_10 (*)
q24.2	86,162,577	86,593,791	431214	Ganho	6	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_02; O_04; O_05; O_08; O_10 (*)
q24.1 - q24.3	84,416,846	88,827,254	4410408	Perda	62	0	21,9	FAR1T; FAR12T; FAR15T; 1025726; 1025827; 1039532; 1102747 (*)
Cromossomo 17								
p13.3 - q11.1	0	22,200,000	22200000	Perda	369	12	25,0	FAR1T; O_05; O_07; 1013417; 1026835; 1039532; 1102747; FAR2T; FAR4T; FAR5T; O_08; O_11; O_12; FAR9T; O_13; 1023767; 1025726; 1025827
q24.3	68,157,971	68,337,321	179350	Ganho	1	0	21,9	FAR1T; FAR5T; FAR11T; O_08; 1025726; 1025827; 1102747 (*)
q25.1	70,789,530	71,810,019	1020489	Ganho	33	0	21,9	FAR11T; FAR15T; O_02; O_08; O_10; 1025827; 1102747 (*)
q25.3	73,719,530	74,356,853	637323	Ganho	8	0	21,9	FAR5T; FAR11T; FAR15T; O_08; O_10; 1025726; 1025827; 1013417
q25.3	76,877,585	78,774,742	1897157	Ganho	58	0	21,9	FAR11T; FAR17T; O_04; O_08; O_10; 1025726; FAR1T; FAR3T; FAR15T; O_02 1025827
Cromossomo 18								
p11.32 - p11.31	0	4,079,724	4079724	Ganho	25	0	21,9	O_02; O_05; O_10; O_13; 1025726; 1026835; 1023767; 1025827; 1039532
q11.1	16,100,000	17,205,887	1105887	Perda	2	0	21,9	FAR4T; O_02; O_04; O_05; O_10; O_14; 1013417 (*)

q12.1	24,373,187	26,226,819	1853632	Perda	1	1	21,9	FAR4T; FAR11T; O_02; O_04; O_05; O_10; O_14 (*)
q12.1	26,806,616	27,397,663	591047	Ganho	7	0	21,9	O_01; O_11; 1025726; 1025827; 1026835; 1102747; FAR5T; 1013417; 1039532 ;
q12.1	28,835,415	30,335,144	1499729	Perda	4	0	21,9	FAR4T; FAR11T; O_02; O_05; O_10; O_14; 1026835; O_04
q12.2 - q12.3	31,974,066	40,667,326	8693260	Perda	12	1	21,9	FAR4T; O_02; O_05; O_10; O_14; 1026835; FAR5T; FAR11T; O_04; O_13 1013417
q21.1	42,265,062	44,586,874	2321812	Perda	16	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_02; O_05; O_10; 1013417; 1026835 (*)
q21.1 - q21.2	46,060,638	50,625,699	4565061	Perda	16	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_02; O_05; O_10; O_11; O_14; 1026835; 1039532
q21.32 - q21.33	55,022,393	57,388,380	2365987	Perda	8	0	21,9	FAR4T; FAR5T; O_01; O_02; O_05; O_10; O_14; FAR11T FAR4T; FAR5T; O_02; O_05; O_10; 1026835; FAR11T; O_04; O_08; O_11; O_14; 1013417; 1023767; O_13
q22.1 - q23	59,902,300	76,117,153	16214853	Perda	41	0	21,9	
Cromossomo 19								
p13.2	8,814,896	9,752,088	937192	Perda	20	0	21,9	FAR15T; O_12; 1013417; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532 (*)
p12	20,022,849	20,068,103	45254	Perda	1	0	21,9	FAR15T; O_12; 1013417; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747 (*)
p12	20,325,552	24,132,581	3807029	Perda	25	1	21,9	FAR15T; O_12; 1013417; 1023767; 1025827; 1039532; 1102747; FAR1T; O_14; 1025726
q13.12	40,316,838	40,333,205	16367	Ganho	3	0	21,9	O_01; O_05; O_08; O_10; O_13; O_14; 1025726 (*)
q13.12	40,613,207	41,232,253	619046	Ganho	34	0	21,9	O_01; O_05; O_08; O_10; O_13; O_14; 1025726; FAR5T; FAR9T
q13.13 - q13.2	43,144,499	44,013,717	869218	Ganho	22	0	21,9	O_01; O_02; O_08; O_13; O_14; 1025726; O_05; O_10 FAR15T; O_02; 1013417; 1026835; 1102747; FAR4T; O_05; O_14; 1023767; 1025827 1039532
q13.33 - q13.42	57,302,738	59,345,207	2042469	Perda	107	51	21,9	
q13.42	60,234,352	60,871,062	636710	Ganho	35	0	21,9	FAR9T; O_05; O_08; O_10; O_13; O_14; FAR6T; 1025726
q13.42 - q13.43	61,182,227	63,457,238	2275011	Perda	66	1	21,9	FAR15T; O_02; O_05; O_10; 1013417; 1026835; 1102747; 1025827
Cromossomo 21								
q11.2 - q21.1	13,342,486	16,850,718	3508232	Perda	14	2	21,9	FAR15T; O_02; O_04; O_07; O_14; 1025827; 1026835; FAR4T; FAR9T; FAR10T; 1013417; 1023767; 1102747; O_13 FAR15T; O_02; O_04; O_07; FAR1T; FAR11T; O_13; O_14; 1013417; 1025726; 1026835;; 1025827
q21.1 - q22.11	17,131,566	33,314,964	16183398	Perda	86	1	21,9	
q22.12 - q22.13	36,486,326	38,493,200	2006874	Perda	15	0	21,9	FAR15T; O_02; O_04; O_07; O_13; 1013417; 1026835; O_14
q22.2 - q22.3	39,617,006	41,975,654	2358648	Perda	17	0	21,9	FAR15T; O_02; O_04; O_07; O_13; 1026835; O_14; 1013417; 1023767
q22.3	43,907,431	43,945,488	38057	Perda	1	0	21,9	FAR15T; O_02; O_07; O_10; O_13; 1013417; 1026835 (*)
q22.3	44,503,882	46,944,323	2440441	Perda	52	0	21,9	FAR15T; O_02; O_07; 1013417; 1026835; 1102747; O_04; O_13; O_14
Cromossomo 22								
q11.21	17,011,937	19,961,412	2949475	Ganho	61	4	21,9	O_04; O_05; O_08; O_10; FAR5T; O_07; O_11; O_12; O_14 ;
q12.3	30,951,175	32,863,247	1912072	Perda	9	0	21,9	FAR15T; O_07; O_13; 1013417; 1025726; 1025827; 1026835; FAR6T
q13.2 - q13.31	41,946,407	43,851,220	1904813	Perda	16	0	25,0	FAR15T; O_07; O_13; 1013417; 1025726; 1025827; 1026835; 1102747 (*)

q13.31 - q13.33	45,999,058	48,446,654	2447596	Perda	3	0	21,9	FAR15T; O_07; O_13; 1013417; 1025726; 1039532; 1102747; 1025827; 1026835
Cromossomo X								
p22.33	112,009	468,228	356219	Ganho	2	0	21,9	FAR5T; FAR6T; FAR9T; O_08; O_10; FAR3T; FAR10T; FAR11T; O_04
p22.33	0	2,715,179	2715179	Perda	18	0	25,0	FAR2T; 1013417; 1025726; 1026835; 1039532; FAR3T; FAR5T; FAR8T; FAR11T; FAR12T; O_02; O_04; O_05; FAR15T; O_13; 1023767; 1102747
p22.33	1,387,385	1,576,994	189609	Ganho	6	0	21,9	FAR3T; FAR5T; FAR6T; FAR9T; FAR10T; FAR11T; O_08 (*)
p22.2	14,821,171	15,541,292	720121	Ganho	8	0	21,9	FAR4T; FAR6T; O_14; 1013417; 1023767; 1025726; 1039532; FAR17T
p21.3	26,425,281	26,481,698	56417	Perda	0	0	21,9	FAR5T; O_02; O_04; O_05; O_10; O_11; O_14 (*)
q21.33	96,689,383	96,762,268	72885	Ganho	1	0	21,9	O_04; O_10; O_14; 1013417; 1023767; 1025726; 1026835 (*)
q21.33 - q22.2	97,808,103	103,041,926	5233823	Ganho	59	0	21,9	O_05; O_10; O_14; 1013417; 1023767; 1026835; FAR6T; O_07; 1025726; 1039532
q22.3	105,121,525	106,720,401	1598876	Ganho	11	0	21,9	O_05; O_07; O_10; O_14; 1013417; 1023767; 1026835 (*)
q22.3	107,109,427	107,454,835	345408	Ganho	5	0	21,9	FAR17T; O_07; O_10; O_14; 1013417; 1023767; 1026835 (*)
q22.3 - q25	108,777,271	122,825,940	14048669	Ganho	140	9	21,9	O_05; O_07; O_10; O_14; 1013417; 1023767; 1026835; FAR4T; FAR6T; FAR11T; O_04; O_12; FAR17T
q25 - q27.2	128,976,290	140,642,636	11666346	Ganho	102	16	21,9	O_10; O_14; 1013417; 1023767; 1102747; FAR6T; O_05; O_07; O_13; 1026835
q27.3 - q28	143,599,475	154,591,809	10992334	Ganho	182	28	21,9	O_13; O_14; 1013417; 1023767; 1102747; FAR4T; FAR6T; FAR17T; O_04; O_05; O_08; O_10; O_12; O_07; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532
q28	154,591,809	154,913,754	321945	Perda	3	0	21,9	FAR2T; FAR15T; O_02; 1025726; 1025827; 1039532; FAR5T; FAR8T; FAR11T; FAR12T; O_08; O_04
Cromossomo Y								
p11.31 - q11.221	2,710,450	18,048,309	15337859	Perda	64	0	50,0 (**)	FAR15T; FAR17T; O_01; O_02; O_04; O_05; O_07; O_08; O_10; O_12; O_14; 1023767; 1025726; O_13; 1026835; 1039532; FAR2T; FAR4T; FAR8T; FAR9T; FAR10T; FAR11T; 1013417; 1025827
q11.222 - q11.223	19,265,164	23,283,748	4018584	Perda	44	0	56,3 (**)	FAR2T; FAR8T; FAR11T; FAR15T; O_01; O_02; O_04; O_05; O_07; O_08; O_12; O_13; O_14; O_10; 1023767; 1025726; 1026835; 1039532; FAR9T; FAR17T; 1013417
q12	57,411,732	57,772,954	361222	Perda	3	0	68,8 (**)	FAR4T; FAR5T; FAR6T; FAR9T; FAR12T; FAR15T; FAR17T; O_02; O_04; O_05; O_10; O_12; O_13; O_07; O_14; 1013417; 1023767; 1025726; 1025827; 1026835; 1039532; 1102747 (*)

*: Casos que englobam somente alterações completas das regiões; **: Alterações presentes em mais de 30% dos casos avaliados.

Tabela Suplementar 3. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 32 carcinomas de orofaringe comparados quanto a infecção por HPV.

Cromossomo 1	Início	Final	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	HPV- (%)	HPV+ (%)	Total (%)	P-Valor
p21.3 - p21.2	99,002,102	101,281,846	Perda	19	1	2279744	35,0		35,0	0,029
p21.2	101,281,846	101,648,251	Perda	1	0	366405	40,0		40,0	0,014
p13.3	107,697,876	108,457,450	Perda	2	0	759574	35,0		35,0	0,029
p13.3	108,457,450	108,875,868	Perda	3	0	418418	40,0		40,0	0,014
p13.3	108,875,868	108,976,479	Perda	1	0	100611	45,0		45,0	0,012
p13.3 - p13.2	108,976,479	115,398,442	Perda	100	1	6421963	40,0		40,0	0,014
p13.2 - p13.1	115,398,442	115,944,559	Perda	2	0	546117	35,0		35,0	0,029
p13.1 - p12	117,592,241	120,339,536	Perda	18	0	2747295	40,0		40,0	0,014
p12	120,339,536	120,378,939	Perda	1	0	39403	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 2										
p14	64,703,678	65,083,911	Ganho	2	0	380233	35,0		35,0	0,029
q22.1	141,759,302	141,769,424	Perda	1	0	10122	35,0		35,0	0,029
q31.1	171,488,247	173,265,097	Ganho	13	0	1776850	35,0		35,0	0,029
q31.1	173,265,097	174,809,370	Ganho	6	0	1544273	40,0		40,0	0,014
q31.1 - q31.2	174,809,370	178,950,282	Ganho	34	3	4140912	35,0		35,0	0,029
q33.1	197,535,455	197,602,912	Ganho	1	0	67457	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 3										
p26.3	0	617,556	Perda	1	0	617556	70,0	25,0	45,0	0,027
p26.3	617,556	1,165,544	Perda	1	0	547988	75,0	25,0	50,0	0,010
p26.3 - p26.1	1,165,544	5,581,901	Perda	13	0	4416357	80,0	25,0	55,0	0,004
p26.1	5,581,901	8,349,277	Perda	2	0	2767376	80,0	33,0	47,0	0,021
p26.1	8,349,277	8,493,579	Perda	1	0	144302	80,0	25,0	55,0	0,004
p26.1	8,493,579	8,594,444	Perda	3	0	100865	80,0	17,0	63,0	0,000
p26.1 - p25.3	8,594,444	9,269,026	Perda	5	0	674582	75,0	16,7	58,0	0,003
p25.3	9,269,026	9,819,502	Perda	11	0	550476	75,0	25,0	50,0	0,010
p25.3	9,819,502	10,165,911	Perda	16	0	346409	70,0	25,0	45,0	0,027
p25.3	10,165,911	10,304,111	Perda	6	0	138200	75,0	25,0	50,0	0,010
p25.3	10,304,111	10,988,114	Perda	7	1	684003	70,0	25,0	45,0	0,027
p25.3	10,988,114	11,311,984	Perda	3	0	323870	75,0	25,0	50,0	0,010
p25.3 - p25.2	11,311,984	11,519,760	Perda	1	0	207776	70,0	25,0	45,0	0,027
p25.2	11,519,760	11,530,258	Perda	1	0	10498	75,0	25,0	50,0	0,010
p25.2	11,530,258	11,602,335	Perda	2	0	72077	80,0	25,0	55,0	0,004
p25.2	11,602,335	11,653,836	Perda	1	0	51501	75,0	25,0	50,0	0,010
p25.2	11,653,836	11,747,623	Perda	1	0	93787	70,0	25,0	45,0	0,027
p25.2 - p25.1	11,747,623	12,624,783	Perda	7	0	877160	75,0	25,0	50,0	0,010
p25.1	12,624,783	12,775,963	Perda	2	0	151180	70,0	25,0	45,0	0,027
p25.1 - p24.3	12,812,811	14,851,443	Perda	19	0	2038632	70,0	25,0	45,0	0,027
p24.3	14,851,443	15,593,396	Perda	11	0	741953	75,0	25,0	50,0	0,010
p24.3	16,484,666	17,287,926	Perda	4	0	803260	70,0	25,0	45,0	0,027
p24.3	17,287,926	17,472,522	Perda	1	0	184596	75,0	25,0	50,0	0,010
p24.3	17,472,522	18,520,595	Perda	2	0	1048073	75,0	33,3	41,7	0,030
p24.3	18,520,595	19,992,002	Perda	3	0	1471407	75,0	25,0	50,0	0,010

p24.3 - p24.2	19,992,002	25,075,584	Perda	13	0	5083582	75,0	33,3	41,7	0,030
p24.1	29,524,544	30,160,209	Perda	1	0	635665	75,0	33,3	41,7	0,030
p21.31	46,629,614	47,837,977	Perda	20	0	1208363	75,0	33,3	41,7	0,030
p21.1	52,747,770	53,186,376	Perda	9	0	438606	75,0	33,3	41,7	0,030
p21.1	53,186,376	53,268,906	Perda	2	0	82530	80,0	33,3	46,7	0,021
p21.1 - p14.3	54,378,015	55,024,419	Perda	3	0	646404	85,0	41,7	43,4	0,018
p13	72,585,863	73,614,844	Perda	5	0	1028981	75,0	33,3	41,7	0,030
p13 - p12.3	73,614,844	75,626,460	Perda	3	0	2011616	80,0	33,3	46,7	0,021
p12.3	75,626,460	75,947,629	Perda	3	1	321169	85,0	33,3	51,7	0,006
p12.3	76,161,762	78,758,624	Perda	2	0	2596862	80,0	25,0	55,0	0,004
p12.3	78,758,624	79,625,223	Perda	1	0	866599	80,0	16,7	63,3	0,000
p12.3	79,625,223	79,871,971	Perda	1	0	246748	75,0	16,7	58,3	0,003
p12.3 - p12.1	79,871,971	85,604,134	Perda	3	0	5732163	75,0	25,0	50,0	0,010
p12.1	85,604,134	85,689,381	Perda	1	0	85247	75,0	33,3	41,7	0,030
p12.1 - p11.2	85,689,381	87,371,958	Perda	3	0	1682577	75,0	25,0	50,0	0,010
p11.2	87,371,958	87,935,187	Perda	2	0	563229	70,0	25,0	45,0	0,027
p11.2	87,935,187	88,486,824	Perda	4	0	551637	75,0	25,0	50,0	0,010
p11.2 - p11.1	89,149,715	90,364,805	Perda	1	0	1215090	75,0	8,3	66,7	0,000
Cromossomo 4										
p16.3	1,337,438	1,774,963	Perda	7	0	437525	45,0	8,3	36,7	0,050
p16.1	7,862,426	8,037,401	Perda	2	0	174975	40,0		40,0	0,014
p16.1	8,037,401	9,511,817	Perda	22	2	1474416	45,0		45,0	0,012
p16.1	9,511,817	9,571,423	Perda	1	0	59606	45,0	8,3	36,7	0,050
p16.1	9,611,497	9,818,344	Perda	2	0	206847	45,0	8,3	36,7	0,050
p12	45,720,331	46,443,736	Perda	3	0	723405	45,0	8,3	36,7	0,050
p12	46,443,736	46,620,264	Perda	2	0	176528	45,0		45,0	0,012
p12	46,620,264	46,654,378	Perda	1	0	34114	40,0		40,0	0,014
p12	46,654,378	46,776,244	Perda	2	0	121866	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 5										
p13.3	32,139,843	32,201,617	Ganho	2	0	61774	60,0	16,7	43,3	0,028
p13.2	35,012,037	36,870,789	Ganho	13	1	1858752	60,0	16,7	43,3	0,028
Cromossomo 7										
p22.1	4,626,354	5,815,863	Ganho	16	1	1189509	40,0		40,0	0,014
p22.1	5,815,863	6,213,280	Ganho	10	0	397417	35,0		35,0	0,029
p22.1	6,213,280	6,387,734	Ganho	3	0	174454	40,0		40,0	0,014
p22.1	6,387,734	6,785,715	Ganho	11	0	397981	35,0		35,0	0,029
p21.3 - p21.2	11,023,940	14,400,618	Ganho	8	0	3376678	35,0		35,0	0,029
p21.2	14,400,618	15,145,863	Ganho	1	0	745245	40,0		40,0	0,014
p21.2 - p21.1	15,145,863	16,131,713	Ganho	3	0	985850	35,0		35,0	0,029
p21.1	16,131,713	16,217,158	Ganho	1	0	85445	40,0		40,0	0,014
p21.1	16,217,158	18,747,714	Ganho	11	1	2530556	45,0		45,0	0,012
p21.1	18,747,714	18,979,266	Ganho	1	0	231552	40,0		40,0	0,014
p21.1 - p15.3	18,979,266	19,731,842	Ganho	5	0	752576	35,0		35,0	0,029
p15.3	19,731,842	20,552,392	Ganho	3	0	820550	40,0		40,0	0,014
p15.3	20,552,392	24,677,625	Ganho	25	1	4125233	35,0		35,0	0,029
p15.3 - p15.2	24,677,625	27,099,700	Ganho	16	1	2422075	40,0		40,0	0,014
p15.2	27,099,700	27,273,173	Ganho	14	1	173473	45,0		45,0	0,012

p15.2 - p15.1	27,273,173	28,628,879	Ganho	5	0	1355706	40,0		40,0	0,014
p15.1	28,628,879	30,656,940	Ganho	18	1	2028061	35,0		35,0	0,029
p15.1	30,656,940	30,700,943	Ganho	1	0	44003	40,0		40,0	0,014
p14.2	35,932,733	36,341,507	Ganho	2	0	408774	35,0		35,0	0,029
p14.2	36,341,507	37,199,065	Ganho	5	1	857558	40,0		40,0	0,014
p14.2 - p14.1	37,199,065	39,862,475	Ganho	15	0	2663410	35,0		35,0	0,029
p13	43,822,737	45,074,449	Ganho	29	0	1251712	40,0		40,0	0,014
p13 - p12.3	45,074,449	47,953,877	Ganho	15	0	2879428	35,0		35,0	0,029
q21.3	92,634,774	92,865,048	Ganho	2	0	230274	40,0		40,0	0,014
q21.3	92,865,048	93,655,956	Ganho	7	2	790908	45,0		45,0	0,012
q21.3	93,655,956	94,249,379	Ganho	4	0	593423	40,0		40,0	0,014
q21.3	94,249,379	94,669,549	Ganho	1	0	420170	35,0		35,0	0,029
q21.3	94,669,549	95,277,122	Ganho	7	0	607573	40,0		40,0	0,014
q22.1	98,515,387	98,800,045	Ganho	4	0	284658	45,0	8,3	36,7	0,050
q22.1	99,527,422	99,652,334	Ganho	15	3	124912	45,0	8,3	36,7	0,050
q22.1	101,277,444	101,290,968	Ganho	1	0	13524	45,0	8,3	36,7	0,050
q22.1	101,869,617	102,157,870	Perda	12	0	288253		25,0	-25,0	0,044
q31.1	107,276,878	109,326,098	Ganho	8	0	2049220	40,0		40,0	0,014
q31.1	109,326,098	109,807,585	Ganho	1	0	481487	45,0		45,0	0,012
q31.1	109,916,697	110,272,110	Ganho	1	0	355413	45,0		45,0	0,012
q31.1	110,272,110	110,363,677	Ganho	1	0	91567	40,0		40,0	0,014
q31.1	110,363,677	110,465,752	Ganho	1	0	102075	35,0		35,0	0,029
q31.1	110,861,896	110,910,157	Ganho	1	0	48261	35,0		35,0	0,029
q31.1	110,910,157	111,199,074	Ganho	2	0	288917	40,0		40,0	0,014
Cromossomo 8										
q11.21	50,143,442	50,236,301	Ganho	1	0	92859	60,0	16,7	43,3	0,028
q11.22 - q11.23	52,756,951	55,101,415	Ganho	10	0	2344464	60,0	16,7	43,3	0,028
q21.3	91,953,579	92,439,128	Ganho	5	0	485549	60,0	16,7	43,3	0,028
q22.1	93,612,479	94,324,370	Ganho	1	0	711891	70,0	25,0	45,0	0,027
q23.3	116,427,724	116,705,825	Ganho	1	0	278101	75,0	33,3	41,7	0,030
q23.3	116,705,825	117,154,415	Ganho	1	0	448590	80,0	33,3	46,7	0,021
q24.3	141,678,870	142,388,222	Ganho	4	1	709352	85,0	41,7	43,3	0,018
q24.3	142,388,222	142,438,205	Ganho	2	0	49983	85,0	33,3	51,7	0,006
q24.3	142,438,205	142,541,830	Ganho	3	0	103625	75,0	33,3	41,7	0,030
Cromossomo 9										
p23	9,145,689	9,933,612	Perda	1	0	787923	60,0	16,7	43,3	0,028
p21.3	21,926,953	21,987,116	Perda	3	0	60163	75,0	33,3	41,7	0,030
Cromossomo 11										
q13.1	64,934,448	65,194,258	Ganho	14	1	259810	45,0	8,3	36,7	0,050
q13.1	65,194,258	65,588,731	Ganho	22	0	394473	50,0	8,3	41,7	0,023
q13.1	65,588,731	66,519,601	Ganho	31	0	930870	55,0	8,3	46,7	0,011
q13.2	67,750,248	67,881,178	Ganho	2	0	130930	50,0	8,3	41,7	0,023
q13.2	67,881,178	67,991,389	Ganho	2	0	110211	55,0	8,3	46,7	0,011
q13.3	69,922,642	70,007,535	Ganho	2	0	84893	55,0	8,3	46,7	0,011
q13.3	70,007,535	70,100,489	Ganho	1	0	92954	50,0	8,3	41,7	0,023
q13.3	70,100,489	70,340,944	Ganho	1	0	240455	45,0	8,3	36,7	0,050
q13.4	72,684,187	72,860,821	Perda	4	0	176634	35,0		35,0	0,029

q13.4	72,860,821	73,193,530	Perda	4	0	332709	40,0		40,0	0,014
q13.4	73,193,530	73,332,105	Perda	3	0	138575	45,0		45,0	0,012
q13.4	73,332,105	74,414,973	Perda	15	0	1082868	50,0		50,0	0,004
q13.4	74,414,973	74,531,292	Perda	1	0	116319	50,0	8,3	41,7	0,023
q13.4	74,531,292	74,696,609	Perda	2	0	165317	45,0	8,3	36,7	0,050
q13.5	74,936,284	75,129,793	Perda	3	0	193509	45,0	8,3	36,7	0,050
q13.5	75,129,793	75,463,708	Perda	2	0	333915	50,0	8,3	41,7	0,023
q13.5	75,463,708	76,143,983	Perda	6	0	680275	45,0	8,3	36,7	0,050
Cromossomo 14										
q12	25,109,029	26,987,720	Perda	1	0	1878691		25,0	-25,0	0,044
q12	29,093,395	29,148,248	Perda	1	0	54853		25,0	-25,0	0,044
Cromossomo 18										
p11.31	3,642,745	4,019,037	Ganho	1	0	376292	40,0		40,0	0,014
q11.1	16,100,000	17,205,887	Perda	2	0	1105887	35,0		35,0	0,029
q12.2	31,974,066	32,386,658	Perda	3	0	412592	35,0		35,0	0,029
q22.1	62,450,190	64,877,949	Perda	3	0	2427759	50,0	8,3	41,7	0,023
q22.1 - q22.3	64,877,949	68,411,505	Perda	5	0	3533556	45,0	8,3	36,7	0,050
Cromossomo 19										
q13.12	40,316,838	40,333,205	Ganho	3	0	16367	35,0		35,0	0,029
q13.12	40,613,207	40,709,640	Ganho	4	0	96433	35,0		35,0	0,029
q13.12	41,087,006	41,232,253	Ganho	8	0	145247	35,0		35,0	0,029
q13.13	43,144,499	43,183,106	Ganho	1	0	38607	35,0		35,0	0,029
q13.13	43,183,106	43,238,383	Ganho	1	0	55277	40,0		40,0	0,014
q13.13 - q13.2	43,238,383	44,013,717	Ganho	22	0	775334	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 21										
q11.2	14,393,070	14,428,408	Perda	1	0	35338	45,0	8,3	36,7	0,050
q11.2 - q21.1	14,484,856	16,609,576	Perda	8	0	2124720	40,0		40,0	0,014
q21.1	16,609,576	16,717,763	Perda	1	0	108187	45,0		45,0	0,012
q21.1	16,717,763	16,835,920	Perda	3	2	118157	40,0		40,0	0,014
q21.1	16,835,920	16,850,718	Perda	1	0	14798	35,0		35,0	0,029
q21.1	17,662,102	17,842,905	Perda	1	0	180803	40,0		40,0	0,014
q21.1	20,983,755	22,618,018	Perda	2	0	1634263	45,0	8,3	36,7	0,050
q21.3 - q22.11	29,666,901	30,954,120	Perda	31	0	1287219	50,0	8,3	41,7	0,023
q22.11	30,954,120	31,276,499	Perda	6	0	322379	45,0	8,3	36,7	0,050
q22.12 - q22.13	36,486,326	37,232,409	Perda	6	0	746083	35,0		35,0	0,029
q22.13	37,232,409	38,493,200	Perda	10	0	1260791	40,0		40,0	0,014
q22.2	39,617,006	39,647,798	Perda	1	0	30792	35,0		35,0	0,029
q22.2	39,647,798	40,331,306	Perda	8	0	683508	45,0		45,0	0,012
q22.2	40,331,306	41,021,730	Perda	1	0	690424	40,0		40,0	0,014
q22.2 - q22.3	41,021,730	41,975,654	Perda	9	0	953924	35,0		35,0	0,029
q22.3	43,907,431	43,945,488	Perda	1	0	38057	35,0		35,0	0,029
Cromossomo 22										
q11.21	19,706,688	19,961,412	Ganho	4	1	254724	35,0		35,0	0,029
q12.3	30,951,175	30,989,798	Perda	1	0	38623	35,0		35,0	0,029
q12.3	31,233,458	32,863,247	Perda	3	0	1629789	35,0		35,0	0,029
Cromossomo X										
q21.33	96,689,383	96,762,268	Ganho	1	0	72885	35,0		35,0	0,029

q21.33 - q22.1	97,808,103	98,744,170	Ganho	1	0	936067	35,0		35,0	0,029
q22.1	98,744,170	99,261,219	Ganho	1	0	517049	40,0		40,0	0,014
q22.1 - q22.2	100,806,318	103,041,926	Ganho	34	0	2235608	35,0		35,0	0,029
q22.3	105,121,525	106,720,401	Ganho	11	0	1598876	35,0		35,0	0,029
q22.3	107,109,427	107,454,835	Ganho	5	0	345408	35,0		35,0	0,029
q22.3	108,777,271	109,440,468	Ganho	4	1	663197	35,0		35,0	0,029
q22.3	109,440,468	109,622,328	Ganho	2	0	181860	40,0		40,0	0,014
q22.3 - q23	109,622,328	114,643,501	Ganho	23	5	5021173	35,0		35,0	0,029
q23	114,991,626	115,531,392	Ganho	3	0	539766	35,0		35,0	0,029
q24 - q25	119,417,663	122,271,026	Ganho	71	0	2853363	35,0		35,0	0,029
q25	122,271,026	122,348,384	Ganho	1	0	77358	40,0		40,0	0,014
q25	122,348,384	122,825,940	Ganho	4	1	477556	35,0		35,0	0,029
q28	148,350,495	148,507,779	Ganho	8	0	157284	45,0	8,3	36,7	0,050
q28	148,507,779	148,645,875	Ganho	2	0	138096	50,0	8,3	41,7	0,023
q28	148,645,875	148,701,013	Ganho	4	0	55138	55,0	8,3	46,7	0,011
q28	148,701,013	148,861,700	Ganho	3	0	160687	60,0	8,3	51,7	0,008
q28	148,861,700	149,494,092	Ganho	4	0	632392	55,0	8,3	46,7	0,011
q28	149,494,092	150,367,325	Ganho	6	0	873233	50,0	8,3	41,7	0,023
q28	150,465,077	151,357,165	Ganho	14	5	892088	50,0	8,3	41,7	0,023
q28	151,357,165	151,552,073	Ganho	1	0	194908	55,0	8,3	46,7	0,011
q28	151,552,073	152,264,149	Ganho	23	0	712076	60,0	8,3	51,7	0,008
q28	152,264,149	152,299,045	Ganho	1	0	34896	60,0	16,7	43,3	0,028
q28	152,299,045	152,389,962	Ganho	3	0	90917	65,0	16,7	48,3	0,012
Cromossomo Y										
p11.31 - p11.2	2,710,450	8,308,564	Perda	23	0	5598114	75,0	25,0	50,0	0,010
p11.2	8,470,950	10,477,304	Perda	30	0	2006354	85,0	33,3	51,7	0,006
q11.1 - q11.21	11,300,000	13,225,902	Perda	1	0	1925902	75,0	8,3	66,7	0,000
q11.21	13,225,902	13,755,244	Perda	3	0	529342	75,0	16,7	58,3	0,003
q11.21 - q11.221	13,755,244	16,278,843	Perda	7	0	2523599	75,0	25,0	50,0	0,010
q11.222 - q11.223	19,281,160	21,673,478	Perda	14	0	2392318	75,0	33,3	41,7	0,030
q11.223	21,673,478	22,187,161	Perda	9	0	513683	80,0	33,3	46,7	0,021

Tabela Suplementar 4. miRNAs identificados em regiões genômicas alteradas no programa *Nexus Copy Number* entre os 32 casos de carcinomas de orofaringe.

miRNA	Região	Evento	Início	Final
hsa-mir-1302-2	1p36.33-p31.1	Ganho	20228	20366
hsa-mir-1977	1p36.33-p31.1	Ganho	556049	556128
hsa-mir-200b	1p36.33-p36.32	Ganho	1092346	1092441
hsa-mir-200 ^a	1p36.33-p36.32	Ganho	1093105	1093195
hsa-mir-429	1p36.33-p36.32	Ganho	1094247	1094330
hsa-mir-1299	9q12	Perda	68292058	68292141
hsa-mir-612	11q13.1-q13.3	Ganho	64968504	64968604
hsa-mir-548k	11q13.1-q13.3	Ganho	69807708	69807824
hsa-mir-1268	15q11.1-q11.2	Perda	20014592	20014644
hsa-mir-662	16p13.3	Perda	760183	760278
hsa-mir-1826	16p12.1-p11.1	Ganho	33873008	33873093
hsa-mir-512-1	19q13.41	Perda	58861744	58861828
hsa-mir-512-2	19q13.41	Perda	58864222	58864320
hsa-mir-1323	19q13.41	Perda	58867033	58867106
hsa-mir-498	19q13.41	Perda	58869262	58869386
hsa-mir-520e	19q13.41	Perda	58870776	58870863
hsa-mir-515-1	19q13.41	Perda	58874068	58874151
hsa-mir-519e	19q13.41	Perda	58875005	58875089
hsa-mir-520f	19q13.41	Perda	58877224	58877311
hsa-mir-515-2	19q13.41	Perda	58880074	58880157
hsa-mir-519c	19q13.41	Perda	58881534	58881621
hsa-mir-1283-1	19q13.41	Perda	58883546	58883633
hsa-mir-520 ^a	19q13.41	Perda	58885946	58886031
hsa-mir-526b	19q13.41	Perda	58889458	58889541
hsa-mir-519b	19q13.41	Perda	58890278	58890359
hsa-mir-525	19q13.41	Perda	58892598	58892683
hsa-mir-523	19q13.41	Perda	58893450	58893537
hsa-mir-518f	19q13.41	Perda	58895080	58895167
hsa-mir-520b	19q13.41	Perda	58896292	58896353
hsa-mir-518b	19q13.41	Perda	58897802	58897885
hsa-mir-526a-1	19q13.41	Perda	58901317	58901402
hsa-mir-520c	19q13.41	Perda	58902518	58902605
hsa-mir-518c	19q13.41	Perda	58903800	58903901
hsa-mir-524	19q13.41	Perda	58906067	58906154
hsa-mir-517 ^a	19q13.41	Perda	58907333	58907420
hsa-mir-519d	19q13.41	Perda	58908412	58908500
hsa-mir-521-2	19q13.41	Perda	58911659	58911746

hsa-mir-520d	19q13.41	Perda	58915161	58915248
hsa-mir-517b	19q13.41	Perda	58916141	58916208
hsa-mir-520g	19q13.41	Perda	58917231	58917321
hsa-mir-516b-2	19q13.41	Perda	58920507	58920592
hsa-mir-526a-2	19q13.41	Perda	58921987	58922052
hsa-mir-518e	19q13.41	Perda	58924903	58924991
hsa-mir-518a-1	19q13.41	Perda	58926071	58926156
hsa-mir-518d	19q13.41	Perda	58929942	58930029
hsa-mir-516b-1	19q13.41	Perda	58931910	58932000
hsa-mir-518a-2	19q13.41	Perda	58934398	58934485
hsa-mir-517c	19q13.41	Perda	58936378	58936473
hsa-mir-520h	19q13.41	Perda	58937577	58937665
hsa-mir-521-1	19q13.41	Perda	58943701	58943788
hsa-mir-522	19q13.41	Perda	58946276	58946363
hsa-mir-519a-1	19q13.41	Perda	58947462	58947547
hsa-mir-527	19q13.41	Perda	58949083	58949168
hsa-mir-516a-1	19q13.41	Perda	58951806	58951896
hsa-mir-1283-2	19q13.41	Perda	58953297	58953384
hsa-mir-516a-2	19q13.41	Perda	58956198	58956288
hsa-mir-519a-2	19q13.41	Perda	58957409	58957496
hsa-mir-371	19q13.41	Perda	58982740	58982807
hsa-mir-372	19q13.41	Perda	58982955	58983022
hsa-mir-373	19q13.41	Perda	58983770	58983839

Tabela Suplementar 5. Genes diferencialmente expressos entre os 32 casos de carcinomas de orofaringe e amostras normais de orofaringe pela análise de expressão gênica global.

Gene	Fold Change	Gene	Fold Change	Gene	Fold Change	Gene	Fold Change
3.8-1	-1,76	A_24_P401069	1,82	AA747799	-2,47	AF318318	2,06
A_23_P119407	1,85	A_24_P409910	-1,59	AA767131	-2,20	AF401032	2,23
A_23_P158868	-3,52	A_24_P460195	-1,86	AADAT	-2,95	AFF2	-2,55
A_23_P170719	2,92	A_24_P490109	-6,10	AASDHPPT	-1,70	AGBL5	-1,52
A_23_P21882	-1,77	A_24_P540555	1,75	ABCD3	-2,93	AGT	1,67
A_23_P3083	3,36	A_24_P623631	1,73	ABCE1	-1,55	AGXT	-1,56
A_23_P31563	-1,64	A_24_P686263	-2,93	ABHD1	-2,76	AHNAK2	2,49
A_23_P32583	3,21	A_24_P698759	-1,51	ABHD11	-1,74	AHRR	1,66
A_23_P4462	-1,71	A_24_P715434	1,61	ABHD7	-1,91	AI090937	-2,48
A_23_P46070	2,12	A_24_P755505	-1,54	ABHD9	-3,42	AI094165	1,75
A_23_P66347	1,70	A_24_P75994	2,34	ACBD6	-1,62	AI420834	1,83
A_23_P72252	-3,74	A_24_P807445	-1,67	ACOT11	1,61	AI423557	2,27
A_23_P77389	2,08	A_24_P88493	-2,54	ACOT11	2,57	AI752947	-1,72
A_23_P98042	-1,60	A_24_P887695	1,78	ACP6	-1,77	AI925475	1,53
A_24_P110487	3,94	A_24_P911754	1,75	ACRBP	1,73	AJ245002	-1,93
A_24_P114463	1,55	A_24_P915894	1,52	ACTA2	2,36	AK000038	1,66
A_24_P136415	-2,18	A_24_P916116	1,50	ACTG2	2,74	AK000422	1,75
A_24_P144487	-1,83	A_24_P918339	1,85	ACTR8	-1,63	AK000872	1,59
A_24_P178154	-2,26	A_24_P921801	1,91	ADAM28	3,07	AK001062	1,56
A_24_P178475	-1,63	A_24_P922120	-1,54	ADAMTS14	1,71	AK021546	-2,27
A_24_P186764	-1,67	A_24_P924739	1,66	ADAMTS2	1,66	AK021576	-2,22
A_24_P1873	1,68	A_32_P103966	-1,85	ADAMTS2	2,55	AK021664	-2,15
A_24_P221285	-2,24	A_32_P125808	-1,51	ADAMTSL2	-1,55	AK021804	2,64
A_24_P221615	1,99	A_32_P142160	1,55	ADCYAP1	1,55	AK022062	-2,84
A_24_P230100	1,85	A_32_P145159	-1,68	ADD2	-2,38	AK022168	1,95
A_24_P230416	-1,68	A_32_P169353	1,57	ADRA1B	1,54	AK022997	1,78
A_24_P255965	-2,12	A_32_P173955	-2,65	AF035040	3,59	AK023121	-2,46
A_24_P273284	-1,85	A_32_P196142	1,55	AF063695	-3,53	AK023328	-1,65
A_24_P281264	1,82	A_32_P200025	1,68	AF070529	1,67	AK023401	-1,54
A_24_P281605	-2,17	A_32_P201620	1,61	AF085846	-1,85	AK023663	-1,98
A_24_P297302	1,64	A_32_P202621	2,10	AF086052	-4,13	AK023737	-1,56
A_24_P322908	-1,58	A_32_P225328	1,86	AF086092	-1,54	AK024173	-2,71
A_24_P33217	1,82	A_32_P22578	2,01	AF086124	-3,22	AK024584	2,09
A_24_P332721	-1,65	A_32_P234853	-1,52	AF086511	2,60	AK024684	-1,59
A_24_P332911	1,70	A_32_P31021	-3,16	AF119913	2,55	AK024870	-1,52
A_24_P346859	3,24	A_32_P51313	-1,79	AF136408	-2,49	AK024938	-3,36
A_24_P349869	1,83	A_32_P599	1,77	AF218021	-2,24	AK025576	-1,76
A_24_P367282	-2,04	A_32_P94976	-2,08	AF229166	-1,53	AK026140	3,68
A_24_P384604	-2,22	AA554330	-1,64	AF233648	2,03	AK026368	-2,00
A_24_P392195	-1,73	AA573434	2,15	AF289590	-2,32	AK026984	1,53

AK027091	-1,52	AK127569	1,64	APOL6	1,99	BBOX1	1,87
AK054902	-1,53	AK128099	1,76	AQP1	-1,79	BC004962	2,19
AK055112	3,94	AK131287	1,62	AQP11	-1,52	BC012876	-2,78
AK055302	-3,11	AK5	1,72	AQP3	-1,56	BC013025	-1,65
AK055372	-1,76	AKAP11	-1,55	AR	2,44	BC013077	-3,94
AK055418	2,24	AKAP7	-2,41	ARG1	-3,83	BC014452	2,11
AK055529	2,32	AKR7A2	1,61	ARHGAP24	-1,97	BC015216	-1,92
AK055647	-2,77	AKT1S1	2,25	ARHGDIG	1,58	BC017972	1,64
AK055716	-4,23	AKT3	1,73	ARHGEF1	-1,60	BC018099	-2,26
AK056809	-1,96	AL049443	2,23	ARHGEF10L	1,52	BC018885	-1,78
AK057591	-2,11	AL109695	-2,02	ARHGEF5	1,66	BC021677	-2,40
AK057720	1,82	AL133118	1,54	ARL13B	-1,66	BC022417	1,54
AK057952	-1,63	AL833303	-1,73	ARL17	-1,83	BC027922	-2,47
AK090762	-1,63	AL834536	-1,65	ARMET	1,69	BC030122	2,75
AK090803	-3,08	ALDH1B1	-1,65	ARPC1B	-3,38	BC030813	-3,88
AK092472	1,54	ALDH2	-1,90	ARRDC4	-1,61	BC031250	1,66
AK092681	-1,52	ALDH5A1	-1,76	ASPSR1	1,55	BC031954	1,81
AK093202	-2,95	ALG9	-1,77	ATCAY	1,86	BC032451	-3,46
AK093532	-2,53	ALKBH6	1,54	ATP11A	-1,76	BC033528	-2,14
AK093982	-1,77	ALOX5AP	2,54	ATP1A4	2,59	BC034930	2,67
AK094187	7,01	ALOXE3	1,69	ATP1B1	-1,62	BC035106	-1,81
AK094477	-3,14	AMICA1	1,61	ATP5L	-2,21	BC035156	-2,92
AK094629	-1,77	AMICA1	2,02	ATP8B4	2,39	BC035417	-5,09
AK094786	-1,56	AMN1	-1,67	ATXN1	1,51	BC035666	-2,07
AK094950	1,61	ANGPTL4	3,52	ATXN7	-2,90	BC036236	5,26
AK095046	-1,78	ANKRA2	-1,52	AUTS2	-2,11	BC037837	-1,56
AK095097	-1,65	ANKRD1	1,82	AUTS2	1,66	BC039021	1,58
AK095151	-1,91	ANKRD12	-1,90	AV707592	-2,76	BC039363	1,58
AK095167	-1,56	ANKRD18A	1,81	AVIL	-1,70	BC039450	-1,85
AK095213	-1,55	ANKRD40	-1,96	AW276186	-2,17	BC040195	-1,59
AK095439	1,53	ANP32C	-3,26	AW365443	1,75	BC042517	2,73
AK096104	-1,79	ANP32E	-1,82	AW819571	-1,56	BC044608	-1,73
AK096405	-1,82	ANPEP	2,31	AW856073	2,01	BC045098	1,63
AK096415	-1,92	ANXA3	1,57	AX721128	-1,62	BC047708	-2,07
AK096537	-1,65	ANXA4	1,67	AXL	2,17	BC048201	-1,63
AK097139	-4,28	AOC3	2,20	AY033611	1,62	BC053353	-2,50
AK097351	-1,57	AP1S2	1,74	AY358681	-2,48	BC062792	-2,24
AK097371	-1,83	AP3M1	-1,52	AY358728	-1,67	BC066989	-1,65
AK097447	3,10	APBA2	-1,58	AY358806	1,75	BC067908	-1,68
AK098417	-1,71	APC2	2,44	AY998685	-5,31	BC071773	-1,54
AK123143	2,00	APCDD1	1,53	AYTL2	-1,54	BC107852	3,02
AK123450	2,91	APITD1	1,73	B4GALNT1	1,93	BCAP31	1,51
AK123722	-2,34	APOBEC3D	2,71	B4GALT6	-3,51	BCKDHB	-1,83
AK124806	1,76	APOL3	1,62	BAIAP2L2	1,76	BCR	1,71
AK126245	-1,84	APOL3	1,97	BAPX1	1,90	BCR	2,49

<i>BDNF</i>	-2,25	<i>BUB3</i>	-1,52	<i>C1orf25</i>	-1,73	<i>CAPN1</i>	1,67
<i>BDNF</i>	3,51	<i>BX091616</i>	1,68	<i>C1orf38</i>	1,62	<i>CAPN13</i>	-1,81
<i>BE165955</i>	-2,40	<i>BX091993</i>	3,13	<i>C1orf51</i>	3,47	<i>CAPNS2</i>	-6,71
<i>BE175081</i>	1,73	<i>BX096603</i>	1,85	<i>C1orf64</i>	2,76	<i>CARD9</i>	-2,39
<i>BE531123</i>	-1,51	<i>BX111520</i>	-1,51	<i>C1QL1</i>	2,83	<i>CASC4</i>	-1,52
<i>BE644770</i>	1,65	<i>BX112397</i>	3,07	<i>C1QTNF1</i>	1,53	<i>CASP2</i>	-1,64
<i>BE703537</i>	-1,86	<i>BX115813</i>	-1,72	<i>C1QTNF4</i>	2,07	<i>CATSPER1</i>	2,17
<i>BE716310</i>	-1,76	<i>BX119852</i>	1,67	<i>C20orf177</i>	-2,58	<i>CB049993</i>	-2,01
<i>BE786351</i>	-2,05	<i>BX373237</i>	2,04	<i>C20orf199</i>	-1,53	<i>CB852269</i>	-2,14
<i>BF509482</i>	-1,59	<i>BX409884</i>	-1,95	<i>C20orf27</i>	-1,50	<i>CB995946</i>	-2,01
<i>BF802139</i>	1,72	<i>BX413319</i>	-1,54	<i>C20orf42</i>	-1,70	<i>CC2D1A</i>	1,52
<i>BF895757</i>	1,59	<i>BX419129</i>	-2,02	<i>C20orf43</i>	1,62	<i>CCDC100</i>	-1,68
<i>BG009439</i>	1,57	<i>BX538139</i>	-2,73	<i>C21orf113</i>	-1,68	<i>CCDC102B</i>	1,51
<i>BG013371</i>	1,60	<i>BX538272</i>	-1,88	<i>C22orf23</i>	1,81	<i>CCDC123</i>	1,94
<i>BG292169</i>	-1,68	<i>BX647619</i>	2,02	<i>C22orf31</i>	1,77	<i>CCDC42</i>	-2,14
<i>BG719660</i>	-1,91	<i>BX647987</i>	5,09	<i>C2orf15</i>	-2,19	<i>CCDC50</i>	-1,78
<i>BI024548</i>	1,71	<i>BX648855</i>	2,04	<i>C2orf33</i>	-2,19	<i>CCDC50</i>	-1,58
<i>BI496440</i>	-1,74	<i>C10orf107</i>	1,63	<i>C3orf50</i>	1,78	<i>CCDC7</i>	-1,93
<i>BI497361</i>	-3,39	<i>C10orf137</i>	-1,90	<i>C3orf63</i>	-1,75	<i>CCDC80</i>	2,21
<i>BICD2</i>	1,66	<i>C10orf63</i>	1,71	<i>C4B</i>	1,60	<i>CCL13</i>	1,76
<i>BIN2</i>	2,05	<i>C10orf65</i>	-2,24	<i>C5orf28</i>	-1,66	<i>CCL18</i>	-3,32
<i>BLR1</i>	2,33	<i>C11orf51</i>	1,59	<i>C6orf134</i>	-1,65	<i>CCL2</i>	1,77
<i>BM668321</i>	1,60	<i>C11orf61</i>	-2,08	<i>C6orf141</i>	2,73	<i>CCL21</i>	-2,87
<i>BM690036</i>	-2,51	<i>C12orf28</i>	-3,17	<i>C6orf167</i>	-1,51	<i>CCL23</i>	2,95
<i>BM913108</i>	1,78	<i>C12orf29</i>	1,51	<i>C6orf168</i>	-3,94	<i>CCL4</i>	-2,31
<i>BM926140</i>	2,09	<i>C12orf48</i>	-2,32	<i>C6orf170</i>	-1,74	<i>CCL5</i>	-1,57
<i>BM932296</i>	-1,58	<i>C12orf56</i>	-1,76	<i>C6orf176</i>	-2,23	<i>CCL8</i>	2,18
<i>BM975266</i>	-1,87	<i>C13orf31</i>	2,53	<i>C7orf23</i>	-3,68	<i>CCND3</i>	-1,75
<i>BM984396</i>	-9,43	<i>C13orf7</i>	-1,50	<i>C7orf46</i>	-2,24	<i>CCND3</i>	-1,71
<i>BMP8A</i>	1,72	<i>C14orf102</i>	-1,54	<i>C8orf12</i>	-2,04	<i>CCNE2</i>	-2,38
<i>BMP8A</i>	2,60	<i>C14orf106</i>	-1,78	<i>C8orf34</i>	1,83	<i>CCPG1</i>	-1,70
<i>BNIP3</i>	1,86	<i>C14orf153</i>	-2,63	<i>C8orf38</i>	-2,20	<i>CCR1</i>	-3,46
<i>BP871540</i>	2,36	<i>C14orf159</i>	1,70	<i>C9orf126</i>	-1,55	<i>CCR3</i>	2,09
<i>BQ000605</i>	-1,89	<i>C14orf162</i>	1,77	<i>C9orf140</i>	1,55	<i>CD209</i>	1,57
<i>BQ017638</i>	2,41	<i>C15orf2</i>	1,77	<i>C9orf21</i>	1,82	<i>CD300A</i>	-1,67
<i>BQ897248</i>	2,29	<i>C15orf28</i>	-1,75	<i>C9orf9</i>	1,60	<i>CD300A</i>	5,33
<i>BQ933774</i>	-2,34	<i>C16orf30</i>	1,67	<i>C9orf93</i>	-2,38	<i>CD300LF</i>	1,64
<i>BRDG1</i>	-2,18	<i>C16orf73</i>	-1,61	<i>C9orf93</i>	-1,59	<i>CD300LF</i>	2,03
<i>BRIP1</i>	-2,35	<i>C17orf86</i>	-1,95	<i>CA12</i>	-1,97	<i>CD34</i>	2,47
<i>BRUNOL6</i>	-1,73	<i>C18orf18</i>	-1,82	<i>CA418661</i>	3,18	<i>CD359021</i>	-1,91
<i>BTBD8</i>	-1,86	<i>C18orf19</i>	-1,84	<i>CA5B</i>	-1,50	<i>CD37</i>	1,55
<i>BU561469</i>	1,99	<i>C19orf2</i>	-1,52	<i>CADPS</i>	-1,54	<i>CD44</i>	1,71
<i>BU632168</i>	-1,53	<i>C19orf48</i>	1,58	<i>CALML5</i>	-3,34	<i>CD63</i>	1,83
<i>BU930695</i>	-1,77	<i>C1orf110</i>	3,70	<i>CAMK2B</i>	-3,01	<i>CD70</i>	1,65
<i>BUB1</i>	-1,65	<i>C1orf113</i>	2,07	<i>CAP2</i>	1,54	<i>CD743044</i>	1,77

<i>CDC2L1</i>	2,20	<i>CIITA</i>	2,14	<i>CR622072</i>	1,69	<i>CAKAD</i>	1,74
<i>CDC2L2</i>	1,75	<i>CINP</i>	-1,67	<i>CR624517</i>	-3,18	<i>DCBLD2</i>	-2,16
<i>CDC2L6</i>	-1,58	<i>CITED1</i>	2,34	<i>CRABP2</i>	1,61	<i>DCC1</i>	-1,50
<i>CDC42BPA</i>	2,34	<i>CITED4</i>	2,14	<i>CRIM1</i>	2,06	<i>DCLRE1A</i>	-1,81
<i>CDC42BPB</i>	1,54	<i>CKAP4</i>	1,99	<i>CRISPLD2</i>	2,10	<i>DDEF2</i>	-3,13
<i>CDCA7</i>	-1,58	<i>CLASP2</i>	-1,99	<i>CRMP1</i>	1,53	<i>DDOST</i>	1,54
<i>CDCA7L</i>	-1,50	<i>CLCA2</i>	-2,18	<i>CRNN</i>	-6,45	<i>DDR1</i>	1,65
<i>CDCP1</i>	1,82	<i>CLCA4</i>	-3,40	<i>CRSP6</i>	-2,34	<i>DDX10</i>	-1,69
<i>CDCP1</i>	2,24	<i>CLDN1</i>	1,66	<i>CRYAA</i>	1,53	<i>DDX31</i>	1,58
<i>CDH1</i>	1,98	<i>CLDN11</i>	1,69	<i>CSF1R</i>	1,89	<i>DDX56</i>	-1,62
<i>CDH23</i>	2,09	<i>CLDN3</i>	-1,61	<i>CSF2RA</i>	1,69	<i>DEFB4</i>	-2,09
<i>CDH24</i>	-2,94	<i>CLEC10A</i>	4,94	<i>CSF2RA</i>	1,95	<i>DENND2C</i>	2,10
<i>CDH26</i>	-2,79	<i>CLEC12A</i>	1,86	<i>CST3</i>	1,66	<i>DERL1</i>	1,53
<i>CDH26</i>	-1,84	<i>CLEC14A</i>	-2,07	<i>CST5</i>	1,68	<i>DFFA</i>	2,04
<i>CDH3</i>	1,78	<i>CLEC4G</i>	1,84	<i>CTAG1A</i>	1,60	<i>DGCR2</i>	1,58
<i>CDH5</i>	1,70	<i>CLEC5A</i>	2,57	<i>CTNND1</i>	2,19	<i>DHRS2</i>	2,18
<i>CDKL5</i>	1,51	<i>CLEC7A</i>	2,62	<i>CTSW</i>	1,54	<i>DHX33</i>	-1,59
<i>CDKN1A</i>	1,69	<i>CLEC7A</i>	3,15	<i>CTXN1</i>	1,72	<i>DIDO1</i>	-1,56
<i>CDKN2A</i>	3,78	<i>CMBL</i>	1,73	<i>CV323793</i>	1,51	<i>DIS3L</i>	-1,62
<i>CDO1</i>	1,66	<i>CMKLR1</i>	2,92	<i>CXCL10</i>	-2,61	<i>dJ222E13.2</i>	2,32
<i>CEACAM1</i>	1,51	<i>CMTM4</i>	3,10	<i>CXCL12</i>	1,71	<i>DKFZp313P036</i>	-2,78
<i>CEACAM1</i>	1,53	<i>CMTM5</i>	1,54	<i>CXCL13</i>	-6,29	<i>DKFZp434F142</i>	1,53
<i>CEACAM4</i>	-1,79	<i>CMTM7</i>	2,71	<i>CXCL2</i>	2,70	<i>DKFZP434I0714</i>	-2,38
<i>CEACAM6</i>	-2,28	<i>CNGA1</i>	-1,51	<i>CXCL3</i>	1,97	<i>DKFZP586H2123</i>	-1,71
<i>CEACAM6</i>	-2,15	<i>CNR1</i>	1,62	<i>CXCL5</i>	3,08	<i>DKFZP586P0123</i>	-1,99
<i>CEBPB</i>	1,80	<i>COG8</i>	1,61	<i>CXCR6</i>	-3,60	<i>DLAT</i>	-2,28
<i>CECR6</i>	1,61	<i>COL10A1</i>	3,60	<i>CXXC6</i>	1,58	<i>DLC1</i>	4,02
<i>CENPK</i>	-2,07	<i>COL17A1</i>	2,62	<i>CYB5R1</i>	2,36	<i>DLEU2</i>	-1,59
<i>CENPT</i>	1,84	<i>COL18A1</i>	1,93	<i>CYCS</i>	-1,54	<i>DLGAP4</i>	1,65
<i>CENTB5</i>	1,64	<i>COL1A1</i>	1,66	<i>CYLD</i>	-1,72	<i>DLST</i>	2,22
<i>CEP152</i>	-1,83	<i>COL1A2</i>	2,05	<i>CYorf14</i>	1,53	<i>DLX2</i>	2,76
<i>CEP55</i>	1,51	<i>COL1A2</i>	2,52	<i>CYorf14</i>	2,77	<i>DLX5</i>	-3,22
<i>CEP57</i>	-1,94	<i>COL2A1</i>	1,58	<i>CYP2C18</i>	-2,13	<i>DMTF1</i>	-1,62
<i>CEP76</i>	-2,20	<i>COL4A1</i>	1,72	<i>CYP2C19</i>	1,89	<i>DMXL2</i>	-1,52
<i>CES2</i>	1,64	<i>COL4A1</i>	1,94	<i>CYP2U1</i>	-1,61	<i>DNAJA4</i>	1,78
<i>CFHR4</i>	2,75	<i>COL6A2</i>	2,67	<i>CYP4A11</i>	1,51	<i>DNAJB1</i>	2,04
<i>CFTR</i>	-2,34	<i>COMMD10</i>	-1,61	<i>CYP4F2</i>	-1,50	<i>DNAJC18</i>	1,62
<i>CG018</i>	-2,35	<i>COMP</i>	2,79	<i>CYP4X1</i>	2,11	<i>DNAL4</i>	1,65
<i>CGGBP1</i>	1,62	<i>CORO2A</i>	1,65	<i>CYR61</i>	1,80	<i>DOCK2</i>	-1,52
<i>CHIC1</i>	-2,65	<i>CORO6</i>	1,57	<i>DACH1</i>	-2,39	<i>DOK2</i>	2,69
<i>CHN2</i>	-2,00	<i>COTL1</i>	2,88	<i>DAG1</i>	1,52	<i>DOK5</i>	2,27
<i>CHRDL2</i>	3,69	<i>COX19</i>	-1,56	<i>DAPK2</i>	1,68	<i>DPY19L1</i>	-2,33
<i>CHRNA5</i>	-2,70	<i>CPAMD8</i>	1,69	<i>DARC</i>	1,59	<i>DPY19L1</i>	-2,03
<i>CHST14</i>	-1,52	<i>CPM</i>	-2,91	<i>DBF4</i>	-2,22	<i>DPY19L2</i>	-2,35
<i>CIITA</i>	1,74	<i>CPXM2</i>	-1,98	<i>DBN1</i>	2,01	<i>DPYSL3</i>	1,56

<i>DRG1</i>	1,56	<i>ENST00000323501</i>	1,59	<i>ETV6</i>	2,09	<i>FLJ13769</i>	-1,79
<i>DSC3</i>	1,81	<i>ENST00000327506</i>	-4,26	<i>EXO1</i>	1,51	<i>FLJ20433</i>	-2,33
<i>DST</i>	1,79	<i>ENST00000335142</i>	1,61	<i>EXOSC10</i>	1,62	<i>FLJ21438</i>	3,25
<i>DUOX2</i>	-1,61	<i>ENST00000335817</i>	-2,22	<i>FAAH2</i>	-1,52	<i>FLJ30428</i>	-1,67
<i>DUSP12</i>	-1,88	<i>ENST00000341955</i>	-1,74	<i>FABP3</i>	-2,54	<i>FLJ30901</i>	2,05
<i>DUX2</i>	1,92	<i>ENST00000344762</i>	-1,61	<i>FABP5</i>	-3,13	<i>FLJ31438</i>	-1,59
<i>DYNC1I1</i>	-3,21	<i>ENST00000355077</i>	1,62	<i>FAM112B</i>	-1,80	<i>FLJ31568</i>	1,79
<i>DYSF</i>	1,82	<i>ENST00000355873</i>	-2,74	<i>FAM120A</i>	-1,61	<i>FLJ32679</i>	1,53
<i>E01979</i>	-1,59	<i>ENST00000357303</i>	1,53	<i>FAM13A1</i>	-1,68	<i>FLJ35767</i>	3,53
<i>E2F2</i>	1,51	<i>ENST00000358378</i>	2,49	<i>FAM29A</i>	-1,56	<i>FLJ35848</i>	-1,51
<i>E2F5</i>	-2,49	<i>ENST00000358984</i>	-2,20	<i>FAM29A</i>	-1,56	<i>FLJ36166</i>	-2,26
<i>E2F6</i>	-2,51	<i>ENST00000360102</i>	-1,81	<i>FAM3D</i>	-2,40	<i>FLJ37078</i>	-3,03
<i>E2F6</i>	-1,77	<i>ENST00000360758</i>	2,00	<i>FAM40B</i>	2,14	<i>FLJ39534</i>	-2,19
<i>ECT2</i>	-1,51	<i>ENST00000366848</i>	-2,21	<i>FAM53B</i>	-1,55	<i>FLJ40142</i>	-1,53
<i>EFCAB1</i>	-1,52	<i>ENST00000367711</i>	-1,59	<i>FAM69B</i>	-2,20	<i>FLJ42953</i>	1,78
<i>EGFL6</i>	3,90	<i>ENST00000369176</i>	1,63	<i>FAM72A</i>	-1,81	<i>FLJ43692</i>	1,85
<i>EGFR</i>	-1,77	<i>ENST00000370378</i>	-2,17	<i>FAM76B</i>	-2,17	<i>FLJ45187</i>	-2,06
<i>EGLN3</i>	-4,04	<i>ENST00000370659</i>	1,84	<i>FAM81A</i>	-2,36	<i>FLJ45422</i>	2,28
<i>EIF2AK1</i>	-2,71	<i>ENST00000370871</i>	1,75	<i>FAM83F</i>	3,06	<i>FLVCR1</i>	-2,06
<i>EIF2C4</i>	-1,99	<i>ENST00000373954</i>	1,57	<i>FAM83H</i>	2,78	<i>FLVCR1</i>	-1,96
<i>EIF3S1</i>	-1,57	<i>ENST00000374537</i>	-1,56	<i>FAM84A</i>	-1,84	<i>FMN2</i>	2,70
<i>EIF3S7</i>	1,75	<i>ENST00000375855</i>	-1,87	<i>FAM90A10</i>	2,08	<i>FMO2</i>	1,53
<i>EIF4E3</i>	1,66	<i>ENST00000377836</i>	1,54	<i>FAM90A9</i>	2,77	<i>FMOD</i>	-1,67
<i>ELAVL1</i>	-1,82	<i>ENST00000378679</i>	-1,77	<i>FANCD2</i>	-1,92	<i>FN1</i>	2,69
<i>ELAVL4</i>	1,57	<i>ENST00000380749</i>	-1,66	<i>FANCI</i>	-1,57	<i>FN1</i>	2,89
<i>ELMO1</i>	-3,34	<i>ENST00000382878</i>	-1,87	<i>FANCM</i>	-1,68	<i>FN1</i>	6,12
<i>ELMO3</i>	1,75	<i>ENST00000390260</i>	-3,06	<i>FAP</i>	3,41	<i>FOSL1</i>	1,72
<i>ELOVL4</i>	2,45	<i>ENST00000390263</i>	-4,60	<i>FARP1</i>	1,95	<i>FOSL2</i>	1,67
<i>ELOVL5</i>	-1,82	<i>ENST00000390271</i>	4,31	<i>FASN</i>	2,16	<i>FOXA1</i>	-1,97
<i>EMP1</i>	3,04	<i>ENST00000390275</i>	-6,21	<i>FBLN2</i>	1,72	<i>FOXA1</i>	-1,58
<i>EMP3</i>	2,28	<i>ENST00000390312</i>	-3,82	<i>FBN2</i>	-1,91	<i>FOXA2</i>	2,11
<i>EMR2</i>	-2,65	<i>ENST00000390539</i>	-1,57	<i>FBXO22</i>	-1,72	<i>FOXD2</i>	2,51
<i>ENDOGL1</i>	-1,85	<i>ENST00000390541</i>	1,57	<i>FBXW2</i>	-2,49	<i>FOXN4</i>	-2,91
<i>ENOX1</i>	-1,50	<i>ENST00000390559</i>	2,63	<i>FCGR3A</i>	-3,16	<i>FOXR1</i>	1,98
<i>ENST00000221282</i>	-2,27	<i>ENST00000390596</i>	-1,69	<i>FCRL1</i>	-1,74	<i>FPR1</i>	-1,87
<i>ENST00000263123</i>	2,28	<i>ENST00000390603</i>	1,84	<i>FECH</i>	-1,90	<i>FREM1</i>	-1,93
<i>ENST00000266661</i>	1,58	<i>ENST00000390624</i>	-1,54	<i>FGD5</i>	1,85	<i>FREM3</i>	1,54
<i>ENST00000283964</i>	1,54	<i>ENTPD3</i>	-2,22	<i>FGF2</i>	-1,74	<i>FRMD4A</i>	-1,57
<i>ENST00000292140</i>	-1,66	<i>ENTPD6</i>	1,56	<i>FGF7</i>	8,94	<i>FRMD5</i>	-1,78
<i>ENST00000298047</i>	-1,78	<i>EPM2A</i>	-2,20	<i>FKBP1A</i>	-1,68	<i>FRMPD4</i>	-1,96
<i>ENST00000308384</i>	1,64	<i>ERRFI1</i>	1,60	<i>FKBP7</i>	1,73	<i>FUT2</i>	2,06
<i>ENST00000308384</i>	2,68	<i>ERRFI1</i>	2,98	<i>FLJ10038</i>	-1,69	<i>FXYD1</i>	2,45
<i>ENST00000310579</i>	-4,93	<i>ERVWE1</i>	1,95	<i>FLJ13195</i>	-1,85	<i>GABPB2</i>	-1,51
<i>ENST00000319373</i>	-1,75	<i>ETS2</i>	2,68	<i>FLJ13236</i>	-1,83	<i>GABRA2</i>	1,61
<i>ENST00000322839</i>	-1,96	<i>ETV5</i>	-2,32	<i>FLJ13769</i>	-1,93	<i>GAD1</i>	1,54

<i>GAL</i>	-2,08	<i>HBD</i>	-2,32	<i>HSPC049</i>	1,53	<i>JMJD1C</i>	1,94
<i>GALNTL4</i>	2,10	<i>HCG27</i>	-1,69	<i>HSPC159</i>	-1,61	<i>JSRP1</i>	2,38
<i>GAPDH</i>	1,85	<i>HCP5</i>	-2,10	<i>HSPDP2</i>	-1,52	<i>JTB</i>	-1,75
<i>GAS2L1</i>	1,93	<i>HCP5</i>	-1,75	<i>HTRA4</i>	-2,26	<i>JUN</i>	1,88
<i>GAS5</i>	-1,77	<i>HDLBP</i>	1,51	<i>IBRDC3</i>	2,45	<i>KALRN</i>	2,30
<i>GATA6</i>	2,60	<i>HEMK1</i>	-1,55	<i>ICA1</i>	-2,94	<i>KBTBD11</i>	-2,21
<i>GATAD1</i>	-2,22	<i>HEPH</i>	1,62	<i>ICAM1</i>	3,00	<i>KCNC1</i>	2,18
<i>GATM</i>	-2,39	<i>HGSNAT</i>	1,59	<i>ICMT</i>	1,85	<i>KCND3</i>	4,15
<i>GCC2</i>	-1,64	<i>HIC1</i>	1,52	<i>ICOS</i>	-1,72	<i>KCNH8</i>	-3,36
<i>GCET2</i>	-1,67	<i>HIST1H2AD</i>	2,06	<i>IFI6</i>	-2,81	<i>KCNQ2</i>	1,55
<i>GCNT1</i>	2,82	<i>HIST1H3C</i>	1,75	<i>IFT52</i>	-1,66	<i>KCNQ3</i>	1,55
<i>GDF1</i>	1,67	<i>HIST1H4B</i>	-1,54	<i>IFT81</i>	1,82	<i>KCTD11</i>	1,56
<i>GDF10</i>	-6,58	<i>HIST1H4L</i>	-1,97	<i>IGF2BP3</i>	-2,49	<i>KCTD14</i>	-1,55
<i>GGT2</i>	2,00	<i>HIVEP3</i>	1,55	<i>IGFBP3</i>	-2,01	<i>KDELR3</i>	2,04
<i>GGTLA1</i>	1,59	<i>HIVEP3</i>	1,56	<i>IGHA1</i>	-3,02	<i>KIAA0182</i>	-1,72
<i>GHRL</i>	2,30	<i>HK3</i>	1,66	<i>IGHA1</i>	-2,63	<i>KIAA0284</i>	1,75
<i>GIPC1</i>	2,61	<i>HKDC1</i>	2,66	<i>IGKV1-5</i>	-2,87	<i>KIAA0467</i>	-1,52
<i>GJB4</i>	1,58	<i>HKDC1</i>	2,73	<i>IGLV6-57</i>	1,97	<i>KIAA0672</i>	-3,30
<i>GLDN</i>	-1,67	<i>HLA-DMA</i>	1,72	<i>IL10</i>	-1,53	<i>KIAA0841</i>	-1,52
<i>GLMN</i>	-1,74	<i>HLA-DPB1</i>	1,51	<i>IL1F5</i>	-2,38	<i>KIAA1026</i>	1,66
<i>GLS</i>	-1,50	<i>HLA-DPB1</i>	1,79	<i>IL1F6</i>	-2,52	<i>KIAA1212</i>	2,64
<i>GMEB1</i>	1,66	<i>HLA-DQA2</i>	-3,75	<i>IL1F9</i>	-2,02	<i>KIAA1324</i>	-2,24
<i>GNPDA2</i>	-2,02	<i>HLA-DRB1</i>	1,62	<i>IL1R2</i>	4,39	<i>KIAA1333</i>	-1,85
<i>GPR109A</i>	1,59	<i>HLA-DRB3</i>	2,56	<i>IL2</i>	1,66	<i>KIAA1432</i>	-1,56
<i>GPR114</i>	-4,61	<i>HLA-DRB4</i>	-1,51	<i>IL2RA</i>	3,56	<i>KIAA1467</i>	2,26
<i>GPR126</i>	-1,54	<i>HLA-G</i>	1,63	<i>IL6</i>	-2,87	<i>KIAA1468</i>	-1,61
<i>GPR4</i>	1,88	<i>HLXB9</i>	4,50	<i>IMPDH1</i>	1,89	<i>KIAA1509</i>	-1,90
<i>GPR84</i>	1,81	<i>HNRPA1P5</i>	-1,65	<i>INCENP</i>	1,79	<i>KIAA1522</i>	1,72
<i>GRAMD1B</i>	-2,84	<i>HOMER3</i>	4,50	<i>INDO</i>	-1,58	<i>KIAA1576</i>	-1,77
<i>GRASP</i>	2,62	<i>HOOK2</i>	1,72	<i>INHBB</i>	2,12	<i>KIAA1609</i>	1,66
<i>GRB14</i>	-1,67	<i>HORMAD1</i>	6,63	<i>INSL3</i>	2,21	<i>KIAA1706</i>	-1,66
<i>GRIA2</i>	-2,39	<i>HOXA11</i>	-2,05	<i>IQCA</i>	-2,92	<i>KIAA1731</i>	-2,26
<i>GRIA3</i>	1,91	<i>HOXA13</i>	-5,21	<i>IRAK3</i>	-1,94	<i>KIAA1804</i>	-1,53
<i>GRIK3</i>	2,02	<i>HOXA5</i>	-3,39	<i>IREB2</i>	-2,14	<i>KIAA1822L</i>	2,58
<i>GRIN3B</i>	1,95	<i>HOXB3</i>	-2,51	<i>IRF4</i>	1,83	<i>KIAA1826</i>	-1,88
<i>GRIP2</i>	1,53	<i>HOXC10</i>	-1,85	<i>IRX1</i>	1,82	<i>KIAA1875</i>	1,53
<i>GSG2</i>	-2,16	<i>HOXC12</i>	-1,94	<i>ITGB2</i>	1,98	<i>KIAA1946</i>	-3,47
<i>GSG2</i>	-1,57	<i>HOXC8</i>	-1,62	<i>ITGB8</i>	-1,67	<i>KIAA2022</i>	-1,56
<i>GSTP1</i>	1,95	<i>HOXC9</i>	-3,17	<i>ITIH5</i>	-2,17	<i>KIF1A</i>	1,87
<i>GTF2IRD2</i>	-1,89	<i>HP</i>	-3,76	<i>ITSN1</i>	1,77	<i>KIF24</i>	-1,53
<i>GVIN1</i>	2,16	<i>HRH1</i>	2,18	<i>ITSN2</i>	-1,57	<i>KIR2DS2</i>	1,60
<i>H3F3B</i>	1,51	<i>HS6ST3</i>	-1,52	<i>ITSN2</i>	1,51	<i>KIRREL</i>	2,62
<i>HAPLN3</i>	1,75	<i>HSD17B11</i>	-1,73	<i>JAK3</i>	1,96	<i>KLC3</i>	2,68
<i>HAT1</i>	-1,56	<i>HSD17B11</i>	-1,71	<i>JARID1D</i>	3,57	<i>KLF12</i>	-2,16
<i>HBB</i>	-2,73	<i>HSPBP1</i>	1,57	<i>JHDM1D</i>	-1,55	<i>KLF6</i>	2,02

<i>KLF6</i>	2,03	<i>LOC132205</i>	1,68	<i>LOC649179</i>	-1,81	<i>MARK1</i>	-1,64
<i>KLHL1</i>	-1,78	<i>LOC134466</i>	3,98	<i>LOC649459</i>	-1,52	<i>MARVELD3</i>	1,59
<i>KLHL15</i>	-1,63	<i>LOC138046</i>	1,78	<i>LOC649915</i>	1,96	<i>MARVELD3</i>	2,30
<i>KLHL23</i>	-2,62	<i>LOC145853</i>	-1,61	<i>LOC650108</i>	2,02	<i>MBD2</i>	1,74
<i>KLK10</i>	-1,64	<i>LOC147650</i>	3,11	<i>LOC651147</i>	1,53	<i>MCAT</i>	1,66
<i>KLK11</i>	-2,46	<i>LOC149351</i>	-2,60	<i>LOC652192</i>	-3,08	<i>MCC</i>	1,64
<i>KLK12</i>	-5,62	<i>LOC155006</i>	2,85	<i>LOC653080</i>	1,59	<i>MCCC2</i>	-1,83
<i>KLK13</i>	-2,61	<i>LOC200169</i>	-1,74	<i>LOC653391</i>	1,81	<i>MCTP2</i>	-1,92
<i>KLK15</i>	1,53	<i>LOC220115</i>	-1,81	<i>LOC728215</i>	-2,29	<i>ME2</i>	-1,88
<i>KPNA5</i>	-2,25	<i>LOC253970</i>	-1,62	<i>LOC732012</i>	-2,02	<i>MED18</i>	-1,79
<i>KRCC1</i>	-1,53	<i>LOC257407</i>	1,64	<i>LOC732221</i>	-1,92	<i>MEF2A</i>	-1,55
<i>KREMEN1</i>	1,65	<i>LOC283143</i>	-3,56	<i>LOC732249</i>	-2,45	<i>MEOX1</i>	1,74
<i>KRT27</i>	-2,65	<i>LOC286260</i>	-1,58	<i>LOC92270</i>	1,51	<i>MEOX2</i>	2,41
<i>KRT6L</i>	3,65	<i>LOC338328</i>	2,73	<i>LONRF2</i>	-4,00	<i>MESP1</i>	-1,56
<i>KRT73</i>	4,27	<i>LOC338591</i>	-2,29	<i>LOR</i>	-2,94	<i>METAP2</i>	-1,52
<i>KRT78</i>	6,17	<i>LOC339240</i>	-4,98	<i>LOXL2</i>	2,34	<i>METTL9</i>	-1,85
<i>KRT8P10</i>	2,43	<i>LOC342732</i>	-2,06	<i>LOXL3</i>	1,74	<i>MFN2</i>	1,66
<i>KRT8P24</i>	-2,10	<i>LOC344382</i>	-1,74	<i>LRCH1</i>	-1,93	<i>MGA</i>	-1,94
<i>KRTAP4-12</i>	1,52	<i>LOC344595</i>	-1,95	<i>LRIG3</i>	-1,52	<i>MGC10955</i>	1,79
<i>KRTAP6-3</i>	1,81	<i>LOC345471</i>	1,74	<i>LRP1</i>	2,08	<i>MGC16121</i>	3,36
<i>KTH12</i>	-1,57	<i>LOC375295</i>	-1,52	<i>LRP8</i>	1,52	<i>MGC16703</i>	2,48
<i>LACTB2</i>	1,53	<i>LOC387763</i>	3,24	<i>LRRC62</i>	2,18	<i>MGC23284</i>	-2,68
<i>LAIR2</i>	-1,51	<i>LOC388002</i>	2,07	<i>LRRC8A</i>	2,33	<i>MGC23985</i>	-1,62
<i>LAMA3</i>	2,36	<i>LOC388969</i>	-1,72	<i>LSMD1</i>	1,95	<i>MGC24039</i>	-2,56
<i>LASS2</i>	-1,62	<i>LOC389831</i>	1,78	<i>LSS</i>	1,95	<i>MGC24039</i>	-1,70
<i>LBH</i>	-1,76	<i>LOC390411</i>	-2,09	<i>LY86</i>	1,52	<i>MGC35295</i>	1,55
<i>LCE3B</i>	-1,80	<i>LOC390595</i>	1,54	<i>LYPD1</i>	1,83	<i>MGC4473</i>	1,66
<i>LCK</i>	1,72	<i>LOC400464</i>	-1,70	<i>LYPD2</i>	-3,61	<i>MGC4655</i>	1,88
<i>LCMT2</i>	-1,64	<i>LOC400707</i>	1,79	<i>LYRM7</i>	-1,58	<i>MICB</i>	1,53
<i>LCN2</i>	-2,18	<i>LOC400794</i>	1,54	<i>LYZL2</i>	1,57	<i>MIER1</i>	1,61
<i>LDOC1L</i>	1,52	<i>LOC400891</i>	1,62	<i>LZTS1</i>	2,74	<i>MKLN1</i>	-1,62
<i>LENG4</i>	1,96	<i>LOC439938</i>	1,58	<i>MADCAM1</i>	1,52	<i>MLLT1</i>	1,64
<i>LEP</i>	2,50	<i>LOC440338</i>	1,66	<i>MAGEA2B</i>	1,79	<i>MLLT11</i>	-2,26
<i>LGALS1</i>	3,44	<i>LOC441572</i>	1,97	<i>MAGEA5</i>	-1,54	<i>MMP25</i>	1,87
<i>LGALS2</i>	-1,53	<i>LOC442461</i>	2,91	<i>MAGEA6</i>	1,76	<i>MMP27</i>	1,51
<i>LIF</i>	1,82	<i>LOC493869</i>	2,73	<i>MAGEA8</i>	1,89	<i>MMP28</i>	1,74
<i>LIFR</i>	-3,77	<i>LOC51336</i>	-1,93	<i>MAGEA9</i>	-8,83	<i>MMP28</i>	2,50
<i>LIMK2</i>	1,74	<i>LOC554248</i>	-1,68	<i>MAGEC1</i>	1,56	<i>MMP9</i>	2,14
<i>LINCR</i>	3,59	<i>LOC642707</i>	1,88	<i>MAP3K6</i>	1,60	<i>MMRN2</i>	1,61
<i>LMNA</i>	1,78	<i>LOC643475</i>	-2,03	<i>MAP3K6</i>	1,65	<i>MOAP1</i>	-1,54
<i>LMNB1</i>	2,04	<i>LOC643641</i>	-2,53	<i>MAP6D1</i>	1,73	<i>MOSPD2</i>	-1,64
<i>LMO2</i>	-1,71	<i>LOC643668</i>	1,67	<i>MAP7D2</i>	-3,17	<i>MPHOSPH1</i>	-1,88
<i>LOC123876</i>	1,82	<i>LOC643744</i>	1,62	<i>MAPK13</i>	1,68	<i>MPP2</i>	2,05
<i>LOC124496</i>	-1,51	<i>LOC644759</i>	1,51	<i>MAPK13</i>	1,71	<i>MSH2</i>	-1,62
<i>LOC131873</i>	1,64	<i>LOC647736</i>	-1,60	<i>MAPK4</i>	1,74	<i>MSR1</i>	2,66

<i>MSR1</i>	3,97	<i>NOS2A</i>	2,20	<i>P53AIP1</i>	1,72	<i>PHTF1</i>	-2,44
<i>MSX2P</i>	-1,87	<i>NOS3</i>	1,61	<i>PACSIN1</i>	-1,54	<i>PHTF2</i>	-2,21
<i>MT1A</i>	3,29	<i>NOTCH1</i>	1,62	<i>PACSIN2</i>	1,56	<i>PI3</i>	-2,53
<i>MT1X</i>	2,77	<i>NOTCH4</i>	1,53	<i>PAH</i>	-1,60	<i>PIGB</i>	-1,64
<i>MTG1</i>	-1,52	<i>NOX4</i>	2,00	<i>PALM2-AKAP2</i>	1,72	<i>PIGW</i>	-1,57
<i>MTHFD1L</i>	-1,65	<i>NOX4</i>	2,16	<i>PALMD</i>	1,72	<i>PIH1D2</i>	-2,06
<i>MTHFR</i>	1,77	<i>NP109842</i>	1,84	<i>PAPLN</i>	3,00	<i>PIK3C2A</i>	-2,22
<i>MTMR2</i>	-2,09	<i>NPAL2</i>	-1,54	<i>PAPSS2</i>	-1,75	<i>PIK3IP1</i>	-1,69
<i>MTO1</i>	-1,68	<i>NPAT</i>	-2,29	<i>PAQR9</i>	1,77	<i>PIK3R3</i>	-2,18
<i>MTP18</i>	2,49	<i>NPFFR2</i>	-1,52	<i>PARP14</i>	-1,70	<i>PIK3R5</i>	2,37
<i>MTRF1</i>	-1,81	<i>NPHS2</i>	3,27	<i>PASK</i>	-2,04	<i>PIP5K1A</i>	-1,75
<i>MUC16</i>	-1,84	<i>NPNT</i>	1,91	<i>PAX7</i>	1,90	<i>PITX1</i>	1,56
<i>MUC17</i>	1,76	<i>NPY</i>	1,90	<i>PBEF1</i>	-3,04	<i>PKHD1</i>	1,73
<i>MUC2</i>	1,81	<i>NR0B1</i>	-2,78	<i>PCDHA1</i>	2,04	<i>PLA2G3</i>	1,73
<i>MXRA8</i>	1,82	<i>NRBP2</i>	1,57	<i>PCDHB2</i>	3,19	<i>PLA2G4C</i>	2,41
<i>MYBL1</i>	-1,80	<i>NRP2</i>	4,28	<i>PCM1</i>	1,52	<i>PLB1</i>	1,93
<i>MYBPC2</i>	2,94	<i>NRSN2</i>	1,52	<i>PCOLCE2</i>	-1,70	<i>PLCB1</i>	-1,94
<i>MYLC2PL</i>	3,81	<i>NSUN4</i>	-1,77	<i>PCSK1N</i>	2,73	<i>PLCB2</i>	2,14
<i>N48043</i>	2,07	<i>NT5C3L</i>	-1,65	<i>PCYT2</i>	1,52	<i>PLCB4</i>	-1,85
<i>NAGS</i>	1,55	<i>NT5M</i>	-2,13	<i>PDCD4</i>	-1,79	<i>PLCL1</i>	-1,56
<i>NAP5</i>	2,96	<i>NTF3</i>	1,67	<i>PDE1C</i>	-1,59	<i>PLCXD1</i>	1,64
<i>NAT14</i>	1,93	<i>NTNG1</i>	-2,34	<i>PDE4D</i>	-2,50	<i>PLEKHA5</i>	1,78
<i>NAT8L</i>	2,69	<i>NTRK2</i>	1,82	<i>PDE4D</i>	-1,61	<i>PLEKHA6</i>	2,20
<i>NAV1</i>	2,46	<i>NUDCD1</i>	-1,60	<i>PDGFC</i>	2,49	<i>PLEKHA8</i>	-2,12
<i>NAV3</i>	3,94	<i>NUDT11</i>	3,37	<i>PDGFD</i>	-1,57	<i>PLEKHC1</i>	1,78
<i>NBEA</i>	-1,79	<i>NUDT13</i>	-2,28	<i>PDGFRB</i>	1,71	<i>PLEKHF1</i>	2,14
<i>NBPF1</i>	2,08	<i>NUDT8</i>	1,57	<i>PDPN</i>	1,52	<i>PLEKHF2</i>	-1,57
<i>NCF4</i>	4,61	<i>NUDT9P1</i>	-1,68	<i>PDZD8</i>	-1,95	<i>PLEKHG1</i>	-2,09
<i>NCOA1</i>	-1,57	<i>NUP160</i>	-1,73	<i>PDZK1IP1</i>	-2,01	<i>PLP1</i>	2,23
<i>NDRG1</i>	1,86	<i>NUP98</i>	-1,57	<i>PEL11</i>	-1,53	<i>PLSCR4</i>	1,52
<i>NFE2L1</i>	1,68	<i>NXPH4</i>	2,47	<i>PEX19</i>	-2,03	<i>PLXNA2</i>	1,51
<i>NFE2L1</i>	2,28	<i>NYX</i>	1,69	<i>PFKFB3</i>	2,34	<i>PLXNB1</i>	1,79
<i>NFX1</i>	-1,58	<i>OLR1</i>	1,92	<i>PFN2</i>	-2,83	<i>PLXNC1</i>	1,86
<i>NHP2L1</i>	1,50	<i>OMD</i>	1,81	<i>PFN4</i>	-2,67	<i>PMCH</i>	-2,15
<i>NIN</i>	-2,50	<i>ONECUT2</i>	1,76	<i>PGBD1</i>	-2,57	<i>PML</i>	1,66
<i>NKX2-5</i>	1,89	<i>ONECUT2</i>	7,12	<i>PGCP</i>	-1,55	<i>PMS1</i>	-1,64
<i>NLN</i>	2,39	<i>OPRS1</i>	1,53	<i>PGLYRP4</i>	2,54	<i>PMS2CL</i>	-1,56
<i>NLRP12</i>	1,56	<i>OPTN</i>	1,75	<i>PGLYRP4</i>	4,65	<i>PODXL2</i>	1,85
<i>NLRP2</i>	1,96	<i>OTOR</i>	1,67	<i>PGRMC1</i>	-1,54	<i>POLI</i>	-1,53
<i>NLRP4</i>	-2,09	<i>OVOS2</i>	-1,56	<i>PH-4</i>	-2,27	<i>POLQ</i>	-1,67
<i>NM_001023566</i>	-2,76	<i>OXCT1</i>	-1,70	<i>PHC3</i>	-2,46	<i>POLR1B</i>	-1,53
<i>NM_024534</i>	-1,84	<i>P11</i>	-2,50	<i>PHF14</i>	-2,98	<i>POLR2D</i>	-2,20
<i>NMNAT2</i>	1,72	<i>P2RX1</i>	1,81	<i>PHF21B</i>	1,64	<i>POLR3D</i>	1,53
<i>NOL12</i>	1,55	<i>P2RY13</i>	4,28	<i>PHF5A</i>	1,68	<i>POPDC2</i>	1,67
<i>NOL6</i>	1,50	<i>P2RY5</i>	-1,85	<i>PHLPPL</i>	-2,02	<i>PPARG</i>	-3,10

<i>PPM1E</i>	-1,66	<i>PTPRO</i>	-2,20	<i>RIMBP2</i>	1,51	<i>SERPINB13</i>	-2,54
<i>PPM1F</i>	2,31	<i>PTPRZ1</i>	1,87	<i>RIT1</i>	-2,11	<i>SERPINB13</i>	-2,52
<i>PPME1</i>	1,63	<i>PTS</i>	-2,00	<i>RMI1</i>	-1,67	<i>SERPINB2</i>	-1,84
<i>PPP1CC</i>	-1,55	<i>PTTG1IP</i>	1,93	<i>RNASE1</i>	-1,78	<i>SERPINE1</i>	-1,63
<i>PPP1R12B</i>	2,21	<i>PTTG3</i>	1,67	<i>RNASEH2B</i>	-1,51	<i>SETD5</i>	-1,80
<i>PPP1R16A</i>	1,93	<i>PVRL3</i>	1,74	<i>RNASET2</i>	-1,97	<i>SF3A1</i>	1,54
<i>PPP4R1</i>	-1,87	<i>PXK</i>	-1,62	<i>RNF111</i>	-1,79	<i>SFRP2</i>	3,66
<i>PRAME</i>	-4,99	<i>PYGO1</i>	-3,20	<i>RNF125</i>	1,56	<i>SFRP4</i>	2,47
<i>PRAME</i>	-2,80	<i>QRSL1</i>	-3,61	<i>RNF175</i>	1,56	<i>SFRS14</i>	-1,62
<i>PRDM1</i>	2,70	<i>RAB10</i>	-1,52	<i>ROBO4</i>	1,95	<i>SGCA</i>	1,72
<i>PRDM15</i>	1,70	<i>RAB18</i>	1,50	<i>ROCK2</i>	-1,90	<i>SGPP2</i>	2,07
<i>PRDM16</i>	-3,11	<i>RAB26</i>	1,51	<i>ROPN1</i>	1,58	<i>SGTA</i>	1,53
<i>PRDM7</i>	1,60	<i>RAB27B</i>	1,63	<i>ROR1</i>	1,96	<i>SH2B3</i>	1,87
<i>PRKACB</i>	-2,75	<i>RAB2A</i>	1,53	<i>ROR1</i>	4,16	<i>SH3BGRL3</i>	2,11
<i>PRKAR2A</i>	2,07	<i>RAB3C</i>	1,87	<i>ROR2</i>	1,52	<i>SH3KBP1</i>	1,77
<i>PRKCA</i>	1,81	<i>RAB3IP</i>	-1,64	<i>RP5-1054A22.3</i>	2,15	<i>SH3PXD2A</i>	1,66
<i>PRKCE</i>	-1,56	<i>RAB7B</i>	2,36	<i>RP6-213H19.1</i>	-1,62	<i>SHANK3</i>	1,65
<i>PRKD3</i>	-2,50	<i>RACGAP1P</i>	-1,68	<i>RPL23A</i>	-1,52	<i>SIGLEC10</i>	2,32
<i>PRKD3</i>	-1,99	<i>RAD50</i>	-1,63	<i>RPS25</i>	-1,69	<i>SIRT5</i>	-1,64
<i>PRKG1</i>	1,53	<i>RAD51L3</i>	-1,59	<i>RRAD</i>	1,83	<i>SKI</i>	2,17
<i>PRKRIR</i>	-1,84	<i>RAD54B</i>	-1,77	<i>RRAD</i>	2,19	<i>SLAIN1</i>	1,56
<i>PRMT6</i>	-1,69	<i>RAGE</i>	2,77	<i>RUNDC2A</i>	1,57	<i>SLAMF1</i>	-2,34
<i>PRO1853</i>	-1,79	<i>RAMP2</i>	1,69	<i>S80931</i>	1,92	<i>SLAMF7</i>	-1,91
<i>PRPF38B</i>	-1,57	<i>RANBP1</i>	1,51	<i>SAA3P</i>	1,80	<i>SLC11A1</i>	1,93
<i>PRPH</i>	1,66	<i>RAPGEF5</i>	-4,51	<i>SACS</i>	-1,63	<i>SLC12A9</i>	-1,59
<i>PRR15</i>	1,54	<i>RASD1</i>	-2,28	<i>SALF</i>	2,49	<i>SLC14A1</i>	2,51
<i>PRRG1</i>	-2,11	<i>RASGEF1B</i>	1,99	<i>SARM1</i>	-2,16	<i>SLC16A6</i>	-1,71
<i>PRRX1</i>	3,78	<i>RBM16</i>	-1,55	<i>SCARNA17</i>	4,24	<i>SLC16A8</i>	1,54
<i>PRSS27</i>	-2,11	<i>RBM26</i>	-1,57	<i>SCD</i>	-1,53	<i>SLC25A38</i>	-1,65
<i>PRSS36</i>	-1,52	<i>RBM35A</i>	-1,60	<i>SCEL</i>	-2,05	<i>SLC25A40</i>	-1,59
<i>PRTG</i>	1,58	<i>RBMX</i>	-1,77	<i>SCGB3A1</i>	-6,05	<i>SLC2A1</i>	2,03
<i>PSMA8</i>	-2,51	<i>RBP1</i>	-1,61	<i>SCOTIN</i>	1,71	<i>SLC2A11</i>	-1,74
<i>PSMC1</i>	1,55	<i>RBPM52</i>	-1,77	<i>SCRN2</i>	1,82	<i>SLC2A9</i>	1,89
<i>PSMC4</i>	1,63	<i>RCBTB1</i>	-1,77	<i>SDHALP1</i>	1,54	<i>SLC2A9</i>	2,80
<i>PSMD2</i>	1,60	<i>RGS12</i>	1,72	<i>SEC13</i>	1,76	<i>SLC36A4</i>	-1,85
<i>PSTK</i>	-1,56	<i>RGS13</i>	-2,46	<i>SEC23IP</i>	-1,57	<i>SLC38A1</i>	-1,63
<i>PSTPIP2</i>	1,84	<i>RGS2</i>	1,91	<i>SECTM1</i>	1,94	<i>SLC38A5</i>	1,64
<i>PTCHD1</i>	2,09	<i>RGS4</i>	2,27	<i>SELP</i>	2,90	<i>SLC43A1</i>	-2,03
<i>PTGDS</i>	1,77	<i>RGS5</i>	-2,51	<i>SEMA3E</i>	-1,92	<i>SLC44A4</i>	1,92
<i>PTGS1</i>	1,77	<i>RGS7</i>	-1,71	<i>SEMA3G</i>	1,89	<i>SLC46A3</i>	-2,46
<i>PTGS2</i>	1,98	<i>RHBG</i>	-1,70	<i>SEPSECS</i>	-1,59	<i>SLC4A2</i>	1,90
<i>PTOV1</i>	1,89	<i>RHOJ</i>	1,91	<i>SEPT2</i>	1,67	<i>SLC5A1</i>	-2,07
<i>PTPN22</i>	1,64	<i>RHOV</i>	-1,51	<i>SEPX1</i>	2,12	<i>SLC5A10</i>	-1,63
<i>PTPN3</i>	1,76	<i>RHPN2</i>	1,66	<i>SERAC1</i>	1,55	<i>SLC6A11</i>	1,58
<i>PTPRF</i>	2,30	<i>RIC3</i>	-2,21	<i>SERPINB11</i>	1,59	<i>SLC6A4</i>	2,21

<i>SLC7A11</i>	1,84	<i>STON2</i>	1,87	<i>THC2534012</i>	-1,81	<i>THC2660448</i>	-1,94
<i>SLC7A6</i>	-1,93	<i>SUHW1</i>	-2,36	<i>THC2536014</i>	-1,75	<i>THC2664068</i>	-2,81
<i>SLCO2A1</i>	3,07	<i>SUHW2</i>	-1,62	<i>THC2537371</i>	-2,85	<i>THC2664263</i>	-2,47
<i>SLCO6A1</i>	2,45	<i>SUZ12</i>	-1,78	<i>THC2537951</i>	-1,85	<i>THC2665444</i>	-2,76
<i>SMCHD1</i>	-1,91	<i>SYT12</i>	1,74	<i>THC2541678</i>	-1,72	<i>THC2667726</i>	4,62
<i>SMCR5</i>	1,55	<i>SYTL1</i>	1,53	<i>THC2541992</i>	2,80	<i>THC2669541</i>	2,58
<i>SMOC1</i>	-1,83	<i>SYTL1</i>	1,78	<i>THC2543594</i>	-1,65	<i>THC2670307</i>	-1,99
<i>SMOC2</i>	-2,02	<i>T82292</i>	1,85	<i>THC2544720</i>	-1,84	<i>THC2670565</i>	-1,65
<i>SMR3A</i>	1,58	<i>TAC1</i>	-1,69	<i>THC2548567</i>	2,83	<i>THC2673265</i>	-2,21
<i>SNRPN</i>	-1,57	<i>TAF15</i>	-2,13	<i>THC2550202</i>	-2,94	<i>THC2674915</i>	-1,63
<i>SNX14</i>	-1,56	<i>TAF5L</i>	-2,12	<i>THC2560976</i>	-1,72	<i>THC2677286</i>	-1,55
<i>SOCS1</i>	1,60	<i>TAGLN3</i>	5,27	<i>THC2570737</i>	2,26	<i>THC2679390</i>	-1,65
<i>SOCS2</i>	-2,43	<i>TBC1D10A</i>	1,83	<i>THC2574620</i>	-1,73	<i>THC2682280</i>	-1,83
<i>SOLH</i>	-2,13	<i>TBC1D22A</i>	1,90	<i>THC2588392</i>	1,90	<i>THC2682885</i>	-2,11
<i>SOX10</i>	1,88	<i>TBC1D2B</i>	-1,88	<i>THC2590522</i>	1,62	<i>THC2683439</i>	1,55
<i>SOX11</i>	2,15	<i>TBC1D8</i>	-1,88	<i>THC2591019</i>	-1,68	<i>THC2684294</i>	1,64
<i>SOX12</i>	2,64	<i>TBX18</i>	2,02	<i>THC2591546</i>	2,63	<i>THC2686110</i>	1,56
<i>SOX3</i>	1,89	<i>TBX21</i>	3,13	<i>THC2596018</i>	-1,61	<i>THC2686750</i>	1,62
<i>SOX8</i>	1,90	<i>TCF7</i>	1,83	<i>THC2604598</i>	1,57	<i>THC2687922</i>	-1,75
<i>SP100</i>	1,64	<i>TCTE3</i>	-1,64	<i>THC2609820</i>	1,69	<i>THC2694186</i>	-1,51
<i>SP140</i>	3,82	<i>TDRD10</i>	4,11	<i>THC2609891</i>	1,51	<i>THC2694693</i>	1,90
<i>SPARCL1</i>	-1,76	<i>TDRKH</i>	-2,67	<i>THC2614148</i>	1,56	<i>THC2694800</i>	-1,64
<i>SPATA6</i>	-2,68	<i>TECT1</i>	-2,53	<i>THC2621771</i>	-1,54	<i>THC2696722</i>	1,84
<i>SPDEF</i>	2,01	<i>TFEC</i>	3,25	<i>THC2622086</i>	-5,53	<i>THC2705431</i>	1,71
<i>SPG20</i>	-1,65	<i>TFF3</i>	-1,78	<i>THC2623121</i>	1,77	<i>THC2705799</i>	-1,83
<i>SPHK2</i>	-1,58	<i>TFPI2</i>	2,89	<i>THC2623335</i>	1,93	<i>THC2706212</i>	1,60
<i>SPINK4</i>	1,67	<i>TFRC</i>	-1,51	<i>THC2626532</i>	1,53	<i>THC2723431</i>	1,74
<i>SPINK5</i>	-1,94	<i>TGFB1I1</i>	2,12	<i>THC2631297</i>	-3,32	<i>THC2723523</i>	-1,88
<i>SPINK7</i>	-1,97	<i>TGM3</i>	-2,53	<i>THC2633920</i>	-2,35	<i>THC2724046</i>	-1,90
<i>SPIRE1</i>	-2,03	<i>THBS1</i>	2,20	<i>THC2638097</i>	-2,62	<i>THC2724353</i>	-3,53
<i>SPIRE2</i>	2,00	<i>THBS2</i>	3,57	<i>THC2641453</i>	-3,09	<i>THC2729051</i>	-1,65
<i>SPN</i>	1,55	<i>THBS4</i>	6,20	<i>THC2642212</i>	-2,57	<i>THC2730628</i>	-1,64
<i>SPOCD1</i>	2,48	<i>THC2481891</i>	-2,55	<i>THC2644803</i>	-2,02	<i>THC2733339</i>	1,50
<i>SPOCK1</i>	5,81	<i>THC2488083</i>	1,77	<i>THC2645398</i>	-6,38	<i>THC2734830</i>	1,85
<i>SPON1</i>	2,30	<i>THC2496620</i>	-2,72	<i>THC2645690</i>	-2,87	<i>THC2738152</i>	-3,68
<i>SPP1</i>	-4,12	<i>THC2496768</i>	1,84	<i>THC2647739</i>	-1,66	<i>THC2739684</i>	-2,51
<i>SPRED2</i>	-1,74	<i>THC2497326</i>	-1,71	<i>THC2648197</i>	-1,62	<i>THC2742572</i>	1,57
<i>SPTA1</i>	-1,78	<i>THC2516487</i>	3,80	<i>THC2651501</i>	1,92	<i>THC2755433</i>	1,56
<i>SRC</i>	1,54	<i>THC2516687</i>	2,10	<i>THC2652429</i>	-1,56	<i>THC2760960</i>	1,55
<i>SSX6</i>	2,24	<i>THC2519126</i>	-2,05	<i>THC2652707</i>	-1,74	<i>THC2762599</i>	-1,76
<i>SSX7</i>	-3,84	<i>THC2525869</i>	1,62	<i>THC2654000</i>	1,71	<i>THC2769953</i>	-2,04
<i>ST6GALNAC1</i>	-1,80	<i>THC2526838</i>	-1,67	<i>THC2658030</i>	-1,68	<i>THC2770932</i>	1,51
<i>STAMBPL1</i>	-3,28	<i>THC2527772</i>	1,74	<i>THC2658991</i>	-1,71	<i>THEG</i>	4,27
<i>STK31</i>	-4,02	<i>THC2527842</i>	1,65	<i>THC2659040</i>	1,50	<i>TIGD3</i>	-1,79
<i>STMN1</i>	1,99	<i>THC2532458</i>	-1,65	<i>THC2659348</i>	-2,73	<i>TLR8</i>	2,62

<i>TM2D2</i>	2,33	<i>TRPM5</i>	2,32	<i>VDR</i>	1,81	<i>ZNF137</i>	-1,94
<i>TMEFF1</i>	-2,26	<i>TRPV2</i>	1,76	<i>VEGFA</i>	2,83	<i>ZNF138</i>	-1,59
<i>TMEFF2</i>	-1,73	<i>TRUB1</i>	-1,63	<i>VIL1</i>	-1,77	<i>ZNF177</i>	-1,74
<i>TMEM100</i>	1,51	<i>TSKS</i>	2,35	<i>VIM</i>	3,51	<i>ZNF195</i>	-1,59
<i>TMEM132B</i>	-1,77	<i>TSNAXIP1</i>	-1,52	<i>VIM</i>	3,70	<i>ZNF197</i>	-1,73
<i>TMEM135</i>	-1,89	<i>TSPAN32</i>	1,75	<i>VNN1</i>	-2,46	<i>ZNF207</i>	-1,90
<i>TMEM136</i>	-2,36	<i>TSPAN8</i>	1,53	<i>VPS13A</i>	-2,10	<i>ZNF222</i>	-1,65
<i>TMEM145</i>	-1,62	<i>TSPAN9</i>	2,64	<i>VPS45</i>	-1,60	<i>ZNF230</i>	-1,61
<i>TMEM156</i>	-2,29	<i>TTBK2</i>	-2,00	<i>VWF</i>	-1,59	<i>ZNF232</i>	-1,88
<i>TMEM22</i>	-1,54	<i>TTC21B</i>	-1,59	<i>WASF3</i>	-1,92	<i>ZNF236</i>	-1,84
<i>TMEM26</i>	1,95	<i>TTC9</i>	2,23	<i>WDSOF1</i>	-2,99	<i>ZNF239</i>	-1,84
<i>TMEM38A</i>	1,75	<i>TLL7</i>	3,05	<i>WFDC1</i>	2,08	<i>ZNF248</i>	-1,89
<i>TMEM41B</i>	-2,13	<i>TUBA3D</i>	1,60	<i>WFS1</i>	1,98	<i>ZNF259</i>	-1,51
<i>TMEM41B</i>	-1,67	<i>TXNDC3</i>	-4,26	<i>WHSC1</i>	-1,63	<i>ZNF267</i>	-1,55
<i>TMEM45A</i>	-2,12	<i>TXNRD3</i>	-1,60	<i>WIPF2</i>	-1,58	<i>ZNF273</i>	-1,55
<i>TMEM97</i>	-1,53	<i>TYR</i>	-1,63	<i>WNT4</i>	1,59	<i>ZNF276</i>	-1,57
<i>TMPRSS11A</i>	-9,83	<i>TYRP1</i>	2,89	<i>WNT7B</i>	1,78	<i>ZNF286A</i>	-1,89
<i>TMPRSS3</i>	1,55	<i>UBE2MP1</i>	1,58	<i>WWC2</i>	-2,61	<i>ZNF329</i>	2,24
<i>TNFAIP8L2</i>	-2,54	<i>UBE2S</i>	1,62	<i>WWOX</i>	2,48	<i>ZNF347</i>	2,38
<i>TNFSF15</i>	1,78	<i>UBE2S</i>	1,86	<i>XO1147</i>	-5,47	<i>ZNF382</i>	-1,57
<i>TNNC2</i>	-2,82	<i>UBE4A</i>	-1,84	<i>XAF1</i>	1,62	<i>ZNF404</i>	-2,25
<i>TNNT3</i>	-2,86	<i>UCA1</i>	2,11	<i>XDH</i>	1,66	<i>ZNF430</i>	-1,71
<i>TNNT3</i>	-1,99	<i>UCP2</i>	1,86	<i>XIST</i>	4,03	<i>ZNF441</i>	-1,83
<i>TOM1L1</i>	-1,61	<i>UGDH</i>	1,74	<i>XKRX</i>	-2,65	<i>ZNF445</i>	-2,02
<i>TOR1AIP1</i>	-1,57	<i>UGT2B10</i>	1,67	<i>XRCC6BP1</i>	-1,92	<i>ZNF493</i>	-1,63
<i>TP53TG3</i>	-2,35	<i>UGT2B11</i>	1,57	<i>XRN1</i>	-1,72	<i>ZNF502</i>	-1,59
<i>TP73L</i>	1,59	<i>UNQ338</i>	1,96	<i>Y11328</i>	-3,20	<i>ZNF545</i>	1,71
<i>TPM3</i>	1,53	<i>UNQ5783</i>	1,71	<i>ZAP70</i>	2,52	<i>ZNF550</i>	-1,76
<i>TPTE</i>	-1,67	<i>UPRT</i>	-1,76	<i>ZBED1</i>	2,09	<i>ZNF559</i>	-1,74
<i>TRDMT1</i>	-1,53	<i>URP2</i>	2,64	<i>ZBED3</i>	-1,60	<i>ZNF588</i>	-3,41
<i>TREM2</i>	2,29	<i>USHBP1</i>	1,96	<i>ZBP1</i>	3,49	<i>ZNF594</i>	-3,18
<i>TRIAD3</i>	-1,65	<i>USP31</i>	1,91	<i>ZBTB47</i>	1,67	<i>ZNF639</i>	-1,71
<i>TRIM52</i>	-3,37	<i>USP42</i>	-1,98	<i>ZC3H10</i>	1,58	<i>ZNF644</i>	-1,60
<i>TRIM52</i>	-1,57	<i>USP6</i>	1,88	<i>ZCCHC11</i>	-2,70	<i>ZNF671</i>	1,73
<i>TRIM58</i>	-1,75	<i>UST</i>	-1,61	<i>ZCD1</i>	-1,55	<i>ZNF738</i>	-1,88
<i>TRIM74</i>	1,68	<i>VAMP4</i>	-2,59	<i>ZDHC1</i>	1,55	<i>ZNF799</i>	-1,58
<i>TRIOBP</i>	2,01	<i>VASP</i>	2,64	<i>ZFYVE28</i>	-1,96	<i>ZNF83</i>	-1,71
<i>TRIP10</i>	1,59	<i>VCAM1</i>	-1,89	<i>ZFYVE28</i>	-1,62	<i>ZNF93</i>	-2,08
<i>TRPC1</i>	-1,90	<i>VDAC3</i>	1,54	<i>ZKSCAN5</i>	-1,59	<i>ZP1</i>	1,86
						<i>ZSCAN29</i>	-1,72

São Paulo, 28 de Julho de 2009.

À
Dra. Silvia Regina Rogatto

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1249/09
"Identificação de Marcadores Moleculares de Resposta à Quimioterapia Neoadjuvante e Associação de Radioterapia e Quimioterapia em Pacientes com Carcinoma Epidermóide de Orofaringe".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 21/07/2009, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 12/05/2009, **aprovaram** a realização do estudo em referência, datado de Março de 2009, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Questionário de Qualidade de Vida da Universidade de Washington, Inventário de Sintomas do M.D. Anderson (MDASI) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

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

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,

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