

RESSALVA

Alertamos para ausência de Capa e Folha de Rosto, não incluídas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Bertonha, Fernanda Bernardi.

O gene PHF21B como candidato a predisposição familiar em cânceres de cabeça e pescoço / Fernanda Bernardi Bertonha. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Assunto CAPES: 20205007

1. Genética 2. Cabeça - Tumores - Aspectos genéticos 3. Pescoço - Tumores - Aspectos genéticos

CDD 575.1

CDD 616.992732

Palavras-chave: Câncer de cabeça e pescoço; Gene de predisposição; História familiar; Sequenciamento direto

Lista de Siglas e Abreviaturas

Genes

PHF21B	PHD finger protein 21B
GAPDH	Housekeeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
RB1	Retinoblastoma 1
TP16	Cyclin-dependent kinase inhibitor p16
DIA1	Cytochrome b5 reductase 3 (CYB5R3)
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
ECGF1	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
PHF4	PHD finger protein 4

Metodologias

PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	PCR qualitativa
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
CGH	Hibridação genômica comparativa
LOH	Perda de heterozigose

Geral

CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
GST	Gene supressor tumoral
SNP	Polimorfismo de base única
UTR	Untranslated region
PHD	Plant homeo domain
ORF	Open reading frame
EST	Expressed sequence tags
BHC	Complexo BRAF-HDAC
CNV	Copy number variation

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático do gene PHF21B.....	13
Figura 2. Diagrama esquemático do cromossomo 22.....	14
Figura 3. Diagrama esquemático do gene PHF21B e ilha de CpG.....	16
Figura 4. Diagrama esquemático da região codificadora do gene.....	27
Figura 5. Diagrama esquemático dos éxons e iniciadores.....	28
Figura 6. Diagrama esquemático do software CodonCode Aligner.....	32
Figura 7. Diagrama esquemático do alinhamento de seqüências.....	34
Figura 8. Diagrama esquemático dos SNPs na região 3'UTR.....	40
Figura 9. Eletroferograma gerado para uma das amostras.....	45
Figura 10. Diagrama esquemático do alinhamento realizado pelo BLAST.....	46
Figura 11. Diagrama esquemático da análise de seqüenciamento para o éxon 7	47

Índice de Tabelas

Tabela 1. Distribuição dos SNPs nas regiões exônicas.....	15
Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes avaliados.....	20
Tabela 3 Caracterização dos iniciadores utilizados na qPCR.....	25
Tabela 4. Resultado da análise de qPCR para o éxon 13.....	36
Tabela 5. Distribuição casuística de acordo com os resultados do éxon 13.....	39
Tabela 6. Resultados da análise de qPCR para o éxon 7.....	42
Tabela 7. Comparação dos resultados da análise de qPCR para os éxons 7 e 13.	43

Sumário

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Introdução.....	1
Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	2
Predisposição familiar de CCECP.....	4
Alterações genéticas e mutações em CCECP.....	8
O gene PHF21B.....	12
Objetivos.....	17
Material e Métodos.....	18
Caracterização das amostras.....	18
Pacientes.....	19
Metodologia.....	21
Extração de DNA.....	21
Análise qualitativa pela RT-PCR.....	22
Análise quantitativa pela PCR em tempo real.....	23
Análise de mutação por seqüenciamento direto.....	26
Análise estatística.....	32
Resultados.....	33
Análise qualitativa de expressão.....	33
Análise quantitativa pela PCR em tempo real.....	34
Seqüenciamento direto do gene PHF21B.....	44
Discussão.....	48
Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas.....	58
Anexos.....	66
Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido	
Anexo 2. Comitê de Ética	

Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) constituem 90% de todos os cânceres de cabeça e pescoço e estão associados a altas taxas de mortalidade, devido ao seu alto potencial infiltrativo. Este é o sexto tumor mais incidente na população Brasileira. Pouca atenção tem sido dada a fatores hereditários envolvidos em sua etiologia, mas estudos iniciais revelaram que os carcinomas orais tendem a se agregar em famílias. Evidências adicionais são fornecidas pela ocorrência de múltiplos tumores primários em pacientes com CCECP, pela associação com história familiar, aparecimento precoce da doença e por membros afetados sem hábitos tabagista e etilista. Em estudos prévios do grupo foi descrita uma associação entre a perda de 22q e história familiar de câncer em pacientes com CCECP, após análise citogenética, análise de LOH e PCR quantitativa em tempo real. O gene PHF21B (PHD finger protein 21B), mapeado em 22q13.31, codifica uma proteína reguladora transcricional e foi selecionado como um gene candidato associado a predisposição familiar em CCECP. Os resultados da PCR quantitativa em tempo real mostraram associação estatisticamente significativa com relação à perda de seqüências do gene e história familiar de câncer em parentes de 1º grau ($P < 0,0001$). Estes dados sugerem que o PHF21B é um gene supressor tumoral candidato envolvido com história familiar em carcinomas de cabeça e pescoço. Para investigar a inativação de um gene supressor tumoral (Knudson, 1971), foram selecionados 13 pacientes com CCECP que mostravam história familiar positiva de câncer e outros 14 casos sem história familiar. Foram considerados como critério para história familiar positiva: parentes de primeiro e segundo graus com câncer; não-fumantes e não-consumidores de álcool; idade igual ou inferior a 56 anos quando do diagnóstico da doença. Foi realizada análise de investigação por seqüenciamento direto nos éxons 7, 8 e 9. Estes éxons foram selecionados por estarem relacionados ao domínio PHD zinc-finger, responsável pela função da proteína PHF21B. Não foram detectadas mutações ou variações significativas nestes éxons. A análise de SNPs (single nucleotide polymorphisms) em toda a extensão do gene mostrou um número reduzido de SNPs nas regiões exônicas e 16 SNPs foram encontrados na região 3' UTR. Uma nova análise pela qPCR foi realizada para o éxon 7 e 15 de 44 casos analisados (34%) apresentaram resultados concordantes com aqueles obtidos para o éxon

13. Em conclusão, os achados sugerem o envolvimento do gene PHF21B no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço em pacientes com história positiva de câncer na família. É necessária uma análise de todos os éxons e junções éxon/intron do gene, assim como o delineamento de outras abordagens que permitam a identificação do primeiro evento mutacional no contexto de uma síndrome de câncer hereditário.

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) represents 90% of all cancers and are associated with high mortality, due to high infiltrative potential. This tumor is the sixth most incident in the Brazilian population. Little attention have been given to hereditary factors involved in their etiology, but early studies showed that oral carcinomas tend to aggregate themselves in families. Additional evidences are provided for primary multiple tumors occurrence in HNSCC patients, to family history association, early disease development and no tobacco and alcohol consumptions. Previously we described an association between 22q loss and cancer family history in HNSCC patients by cytogenetics, LOH and real time PCR analysis. The PHF21B gene (PHD finger protein 21B), mapped at 22q13.31, codifies a transcriptional regulatory protein and was selected as a putative gene associated with HNSCC familial predisposition. The real time PCR results showed statistical significant association related to gene loss and first degree family history ($P < 0,0001$). This data suggests that PHF21B is a tumor suppressor gene candidate involved in HNSCC family history. To investigate the tumor suppressor gene inactivation (Knudson, 1971), were selected 13 HNSCC patients that had positive cancer family history and other 14 without HNSCC family history. It was considered for positive family history: first and second relatives with cancer; no tobacco and alcohol users; age 56 or less at diagnosis. Investigation analysis was performed by direct sequencing at exons: 7, 8 and 9. These exons were selected for its relation to PHD zinc-finger domain, responsible for PHF21B protein function. No mutations or significative variations were found in these exons. The SNPs (single nucleotide polymorphisms) analysis in gene extension showed a reduced SNPs number in exonic regions, however 16 SNPs were found at 3' UTR region. Real-time PCR analysis was performed to exon 7 and 15 out of 44 analysed cases (34%) presented similar results to those obtained to exon 13. In conclusion, these findings suggest the PHF21B gene involvement in head neck development in patients with positive family history. A further analysis of all exons and exon/intron junctions of the gene is necessary, as well as outline other approaches that allow the identification of the first mutational event in the context of a hereditary cancer syndrome.

O câncer surge a partir da proliferação celular descontrolada de uma única célula, clonal em origem e resultante do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas (Braakhuis et al., 2005).

Devido à complexidade e à existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação do tumor. Cada nova alteração é acompanhada de expansão clonal e, ao final do processo, há o surgimento de uma população celular com grande potencial proliferativo e invasivo: um tumor maligno (Parmigiani e Camargo, 2004).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000) são necessárias no mínimo seis alterações que afetam os processos fisiológicos celulares e que caracterizariam a transformação maligna: 1) auto-suficiência a sinais de crescimento celular; 2) insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento celular; 3) evasão dos programas de morte celular programada (apoptose); 4) potencial ilimitado de duplicação; 5) angiogênese sustentada e 6) invasão tecidual e metástase. Entretanto, após a transformação maligna, as células tumorais devem ser capazes de escapar dos mecanismos de defesa do organismo para gerar a doença (Viola et al., 2004).

A ativação dos proto-oncogenes juntamente com a inativação dos genes supressores tumorais são as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral (Ponder, 2001; Hahn e Weinberg, 2002). Uma vez que os supressores tumorais controlam negativamente a proliferação e a sobrevivência celulares, mutações deletérias da função destes genes contribuem para o desenvolvimento do câncer. Em contraste com os mecanismos de ativação dos

proto-oncogenes, para a maioria dos genes supressores tumorais as mutações inativadoras são recessivas em ação.

A hipótese de Knudson (Knudson, 1971) propõe a necessidade de eventos para inativação de um gene supressor tumoral. O exemplo clássico refere-se ao retinoblastoma hereditário e esporádico que estariam associados a dois eventos mutacionais que levariam à perda da função do gene RB1. No retinoblastoma hereditário, um alelo mutado é herdado pelo indivíduo, mas a inativação somática do segundo alelo (por perda de heterozigose, metilação, mutação, ou outro evento) é necessária para o desenvolvimento tumoral. Da mesma forma, no retinoblastoma esporádico a célula com o evento adquirido ou sua descendente deveria adquirir um segundo evento de mutação promovendo a perda da função do gene RB1.

Carcinoma de Células escamosas de Cabeça e Pescoço (CCECP)

Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) constituem 90% de todos os cânceres de cabeça e pescoço e estão associados a altas taxas de mortalidade, devido ao seu alto potencial infiltrativo (De Herdt e Baatenburg de Jong, 2008). A formação e progressão desses tumores são processos multissistêmicos e envolvem o sistema imunológico, vascularização (incluindo angiogênese) e disseminação (invasão tumoral local e metástases à distância) (Walsh et al., 2007).

Estes carcinomas compreendem um grupo heterogêneo de tumores originários do epitélio muco-escamoso que ocorre em várias regiões e sub-regiões anatômicas, incluindo o lábio, cavidades oral e nasal, faringe, laringe, ouvido médio e glândulas salivares (Schantz et al., 1993; Hunter et al., 2005). Embora

histologicamente semelhantes, os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço apresentam diferença em relação ao padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico (Takes et al., 1998; Reis et al., 2002a; Chin et al., 2004; Hunter et al., 2005).

O CCECP continua sendo uma causa significativa de morbidade e mortalidade (Stewart e Kleihues, 2003). O uso de radioterapia adjuvante pós-cirurgia e quimioterapia e radioterapia concomitantes aumentaram as taxas de sobrevida em cinco anos para os carcinomas avançados de laringe e faringe, mas não houve aumento na sobrevida para os carcinomas orais e carcinomas de laringe iniciais (Carvalho et al., 2005).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer categoriza os carcinomas de cabeça e pescoço como a sexta neoplasia mais incidente (<http://www.inca.gov.br>), com destaque para as altas taxas encontradas na região sudeste do Brasil (Parkin et al., 1993). O câncer de laringe no Brasil, é um dos mais comuns a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área e 2% de todas as doenças malignas. As estimativas de novos casos de câncer para 2008 revelaram que os carcinomas de cavidade oral serão responsáveis por 10.380 novos casos entre homens e 3.780 novos casos entre as mulheres (<http://www.inca.gov.br>). As características clínicas da doença na população brasileira são distintas quando comparadas às da população norte-americana, estando relacionada ao consumo ainda maior de álcool e tabaco, doença mais avançada ao diagnóstico e a alta taxa de um segundo tumor primário (Carvalho et al., 2000).

A idade média de apresentação da doença é 64 anos (Chen et al., 1990; Devesa et al., 1995). Alguns estudos retrospectivos relataram um pior prognóstico em pacientes mais jovens (idade inferior a 30 anos) (Son e Kapp, 1985; Depue,

1986; Schantz et al., 1989). No entanto, outros dados sugerem que a história natural dos CCECP pareados por estadiamento da doença é a mesma em pacientes de diferentes faixas etárias (Sham et al., 1990; Verschurr et al., 1999). A doença acomete mais homens do que mulheres, numa razão de 2:1. No entanto, houve um aumento no número de mulheres afetadas nas últimas décadas, presumivelmente devido ao maior consumo de tabaco pela população feminina (Devesa et al., 1995).

Entre os principais fatores de risco associados a estes carcinomas está o consumo de álcool e o de tabaco. Rodriguez et al. (2004) mostraram que há um aumento de 20 vezes no risco de desenvolver carcinomas orais e de faringe em indivíduos com idade inferior a 46 anos e tabagistas, e um risco aumentado em cinco vezes para consumidores assíduos de álcool. Quando combinados (consumo de álcool e tabaco) há um risco aumentado de quase 50 vezes.

Predisposição Familiar e CCECP

A característica central pela qual a predisposição hereditária é reconhecida clinicamente é a história familiar. O câncer é uma doença comum, por isso algumas famílias poderão ter um excesso de indivíduos afetados ao acaso (Ponder, 1990). Os tumores com características hereditárias representam 1% a 10% de todos os tumores. A identificação de famílias com predisposição hereditária ao câncer é de fundamental importância, pois seus integrantes podem apresentar alto risco para o desenvolvimento de tumores. O rastreamento e o seguimento adequado destes indivíduos são determinantes para o diagnóstico precoce de câncer, aumentando as chances de cura. A compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento dos tumores hereditários permite ampliar o conhecimento sobre a genética do câncer (Santos et al., 2007).

Além do consumo de tabaco e da exposição individual ao álcool, fatores ocupacionais, radiações, bem como deficiências nutricionais e infecções virais, representam outros fatores etiológicos (Alberg et al., 2000; Chen et al., 2001; Olshan et al., 2001; Sturgis e Wei, 2002; Hein, 2002; Rushton, 2003; Gillison, 2004; Fakhry e Gillison, 2006), cujas interações resultam numa diversidade de efeitos que apóiam a hipótese de doença multifatorial (Varzim, 2000). Contudo, em conjunto estes fatores de risco não explicam adequadamente 5 a 10% dos casos de CCECP (Koch et al., 1999; Zhang et al., 2000).

Esta disparidade sugere a existência de suscetibilidade genética para o desenvolvimento destes tumores. Além disso, há evidências que reforçam a idéia da predisposição genética incluindo o risco aumentado de CCECP entre parentes de primeiro grau de pacientes portadores destes tumores, presença da doença em pacientes jovens e de pacientes com CCECP sem história de exposição a agentes carcinogênicos conhecidos (revisado por Canevari e Rogatto, 2004). Em adição, a presença de múltiplos cânceres primários em um indivíduo é um indicador de predisposição hereditária para o câncer.

As síndromes de cânceres hereditários associadas a mutações na linhagem germinativa, com alta penetrância, podem levar a um grande número de indivíduos afetados em uma mesma família. Entretanto, acredita-se que apenas 5% dos cânceres humanos estejam associados a estas mutações. Mais de 200 síndromes de câncer hereditário foram descritas, a maioria possui herança autossômica dominante. Embora muitas dessas sejam síndromes raras, elas representam uma proporção substancial de morbidade e mortalidade na população humana.

A grande maioria dos estudos moleculares em CCECP concentra-se em investigações de mutações somáticas específicas das células tumorais. Poucos

estudos epidemiológicos têm discutido a influência familiar herdada como fator de risco (Marsh e Zori, 2002). Até o momento, não são conhecidos os riscos associados a mutações em um gene de alta penetrância, como as mutações predisponentes em genes supressores de tumor e os mecanismos que envolvem o acúmulo de mutações em vários genes.

Inicialmente, o papel dos fatores hereditários em tumores de cabeça e pescoço foi sugerido a partir de relatos clínicos (Tashiro et al., 1986; Hara et al., 1988). Subseqüentemente, estudos caso-controle apoiaram esta associação inicial. Vários relatos demonstraram uma proporção significativa de cânceres em famílias de pacientes com CCECP, apresentando um risco aumentado de desenvolvimento destes tumores quando comparados a famílias-controle sem história de câncer. Goldstein et al. (1994) observaram que o risco para indivíduos com história positiva de câncer na família era de 1,4 para câncer oral e de 2,3 para carcinoma de faringe entre pais e irmãos. Cooper et al. (1995) estimaram o risco relativo para CCECP de 3,5 em associação com câncer de cabeça e pescoço ou pulmão entre os parentes de primeiro grau de pacientes com CCECP. Entretanto, este risco elevou-se para 14,6 quando foi considerada somente a irmandade. De forma semelhante, Foulkes et al. (1995) demonstraram uma forte associação entre o risco aumentado de câncer de cabeça e pescoço entre parentes de pacientes com este tipo de câncer: 1,97 entre parentes de primeiro grau com qualquer tipo de câncer, aumentando para 3,65 se o parente também apresentasse câncer de cabeça e pescoço. Neste estudo, riscos significativamente maiores foram associados principalmente com a presença de irmãos e pais com CCECP. Acredita-se que os fatores ambientais compartilhados entre indivíduos de uma mesma família não seriam suficientes para explicar estes dados, pois há diferenças claras entre o risco apresentado entre irmãos e os outros parentes de primeiro grau. Devido aos fatores genéticos

herdados, irmãos apresentam um alto risco para o desenvolvimento de neoplasias (Yu et al., 1999).

A agregação em famílias pode estar associada com a capacidade diminuída de reparo a danos no DNA, o que sugere a possibilidade de mutação herdada num gene específico (Loeb e Loeb, 2000). Jefferies et al. (2001) avaliaram 40 pacientes que desenvolveram CCECP e posteriormente, um segundo tumor primário para mutações na linhagem germinativa do gene TP16. A ausência de mutações no gene TP16 levou à conclusão de que este gene não possuía um papel preponderante na predisposição ao CCECP nestes pacientes. Em estudo mais recente, Lang et al. (2002) detectaram um caso com uma provável mutação na linhagem germinativa no gene TP16. No mesmo ano, Yu et al. (2002) identificaram uma família com alta incidência de CCECP e melanoma associado com uma mutação na linhagem germinativa no éxon 2 do gene TP16. Os autores sugeriram que, nesta família, houve uma relação causal entre a mutação e a presença dos CCECP e que, portanto, o CCECP familiar deveria ser incluído como uma nova entidade dentro do conjunto de cânceres hereditários relacionados às mutações no gene TP16. Até o momento, não temos conhecimento de outros relatos indicando genes candidatos ao desenvolvimento de CECCP.

O HNPCC (câncer colorretal hereditário sem polipose) foi o primeiro modelo a ser utilizado no estudo dos cânceres familiares. Para tanto, foram desenvolvidos critérios diagnósticos definidos por convenções. Em 1991, foi estabelecido um critério diagnóstico, conhecido como Critério Amsterdam I (Vasen et al., 1991). Este critério foi considerado muito estrigente, tanto para aplicação clínica quanto para pesquisa, sendo assim, em 1999, foram propostas algumas alterações incluindo cânceres extra-colônicos (Critério Amsterdam II) (Vasen et al., 1999). Entretanto, muitos estudos mostraram que somente 40 a 80% das

famílias pertenciam ao critério original, e não mais que 50% estavam inseridas no critério modificado, por apresentarem mutações associadas aos genes de reparo a danos no DNA (Bisgaard et al., 2002). Por esta razão foi desenvolvido o terceiro critério – Critério de Bethesda (Rodriguez-Bigas et al., 1997; revisado por Umar et al., 2004). Este teste é considerado como altamente específico e deve ser utilizado apenas como um teste de triagem.

A identificação de marcadores de suscetibilidade e de genes de predisposição é de fundamental importância na predição dos riscos (Albertini, 1999; Rossit e Conforti-Froes, 2002). Entretanto, a definição de uma nova síndrome de câncer hereditário deve estar baseada em critérios bem definidos de inclusão e exclusão de indivíduos ou famílias.

Alterações Genéticas e Mutações em CCECP

Embora algumas mutações germinativas possam levar à predisposição que aumenta substancialmente o risco individual de desenvolvimento de tumores, pode-se dizer que, de modo geral, o câncer é uma doença genética de células somáticas que ocorre em um processo de múltiplas etapas. É geralmente aceito que os CCECP se originam de uma célula progenitora pré-maligna comum seguida pelo crescimento de populações clonais associadas a alterações genéticas cumulativas e progressão fenotípica para um processo maligno invasivo (Nawroz et al., 1994; Califano et al., 1996, 2000). Estas alterações genéticas que controlam o reparo do DNA, proliferação, imortalização, apoptose, invasão e angiogênese resultam na inativação de genes supressores tumorais e ativação de proto-oncogenes. Assim, um alvo central na pesquisa do câncer tem sido identificar quais são os genes que caracterizam o fenótipo tumoral.

Os genes supressores tumorais (GST) estão envolvidos na supressão da proliferação celular quando funcionalmente normais e levam ao aparecimento do tumor apenas quando os dois alelos estão ausentes ou inativos (Sandberg et al., 1988; Weinberg, 1991). A inativação de um GST qualquer pode ocorrer por danos genômicos causados por mutação, deleções, rearranjos cromossômicos, conversão gênica, imprinting, recombinação mitótica ou mecanismos epigenéticos que resultam na perda de sua função e na perda da regulação do crescimento celular normal. A perda da função normal destes genes é o evento crítico em muitos, possivelmente todos, os tumores humanos (Weinberg, 1991; Cavennee e White, 1995; Verma e Triantafillou, 1998).

Múltiplos eventos genéticos, como mutações em ponto, deleções e monossomias são freqüentemente relatadas nesses tumores. A análise cromossômica em tumores de cabeça e pescoço tem revelado heterogeneidade genética e uma grande complexidade cariotípica. Em uma meta-análise dos relatos publicados em literatura e dados disponíveis em bancos contendo análises de hibridação genômica comparativa (CGH) em CCECP (<http://www.helsinki.fi/cmg/>), Canevari e Rogatto (2004) demonstraram que as regiões mais freqüentemente envolvidas em ganhos foram 1q, 3q, 5p, 7, 8q, 9q, 11q, 16p, 17q, 19, 20 e 22q, enquanto perdas foram detectadas em 1p, 2q, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 17p, 18q, 19, 21q e 22q. As regiões preferencialmente envolvidas em não balanceamentos genômicas permitem a inferência de regiões potencialmente candidatas para a localização de oncogenes e genes supressores tumorais em CCECP.

Embora os carcinomas de cabeça e pescoço tenham sido extensivamente estudados por técnicas de citogenética clássica (Mitelman et al., 2007; <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) e de CGH (Knuutila et al.,

2000; Struski et al., 2002; <http://www.helsinki.fi/cmgi>), ainda é pouco estabelecida a correlação entre as anormalidades cromossômicas específicas e os dados clínicos, incluindo história familiar de câncer.

Um estudo citogenético prévio realizado por nosso grupo (Bérgamo et al., 2005) em 64 pacientes não tratados com carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço primários detectou várias alterações numéricas envolvendo, com frequência, monossomia total ou parcial do cromossomo 22 [del(22)(q13.1)]. Este estudo demonstrou que perdas de 22q13.1-qter correlacionavam-se com sobrevida diminuída e história familiar de câncer. O padrão de alterações cromossômicas observadas neste estudo e a identificação das alterações cromossômicas mais freqüentes foram consistentes com outros relatos de CCECP (Mertens et al., 1997; Scully et al., 2000; Gollin et al., 2001; Jin et al., 2002; Mitelman et al., 2004). Em concordância com nossos resultados, Ashman et al. (2003), mostraram que a deleção 22q estava associada com uma sobrevida reduzida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, sugerindo que esta anormalidade é um marcador prognóstico independente. As anormalidades afetando o braço longo do cromossomo 22 são comuns em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Segundo o banco de dados de Mitelman et al. (2008), com 54.680 casos catalogados, 12 casos com alterações em 22q13-qter foram cariotipados, incluindo carcinomas da cavidade oral: dois casos, del(22)(q13); carcinomas de língua: cinco casos, del(22)(q13) e laringe: cinco casos, del(22)(q13).

A perda da função de um gene supressor tumoral tem sido investigada indiretamente por ensaios de perda de heterozigose (LOH). Acredita-se que um número considerável de genes supressores tumorais esteja envolvido no desenvolvimento de CCECP, pois vários estudos relataram padrões complexos de perdas alélicas nestes tumores. Esta análise demonstrou que as regiões mais

freqüentemente estudadas por LOH em CCECP foram 1p, 1q, 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 17p e 18q (para revisão, Canevari e Rogatto, 2004). No conjunto, estes dados demonstraram múltiplas regiões genômicas que provavelmente contenham genes supressores tumorais ainda não identificados. Estudos de LOH envolvendo o cromossomo 22 neste tipo tumoral são raros em literatura. Miyakawa et al. (1998) avaliaram 33 carcinomas orais primários, cinco amostras metastáticas e tecidos normais correspondentes e observaram uma maior freqüência de LOH (11/27 casos informativos) para o marcador D22S274 (22q13.31).

Em outro estudo da nossa equipe e baseado nos relatos citogenéticos prévios (Bérgamo et al., 2005), foi selecionada a região 22q11.2-13 para análise de LOH usando quatro marcadores polimórficos em 50 amostras de CCECP (Poli-Frederico et al., 2000). Neste estudo, 19/50 (38%) amostras informativas revelaram LOH em uma ou mais regiões em 22q: 28% (14/50 casos) mostraram perdas para o marcador D22S421, 10% (5/50 casos) para o marcador D22S277, 8% (4/50 casos) para o marcador D22S446 e de 4% (2/50 casos) para o marcador D22S280. Os tumores de laringe apresentaram uma das maiores freqüências de LOH em comparação com os tumores orais. Subseqüentemente, Reis et al. (2002a) identificaram duas regiões independentes de LOH em tumores de laringe (22q11.2-12.1) e da cavidade oral (22q13.1-13.31) e relataram que os tumores orais mostraram uma região preferencial de perda em 22q13.31 para o marcador D22S274. Estes resultados foram concordantes aos dados de Miyakawa et al. (1998) que sugeriram a existência de um provável gene supressor tumoral em 22q13.3.

Para confirmar estes achados, Reis et al. (2002b) analisaram, por PCR em tempo real (qPCR), 40 carcinomas primários de células escamosas da cavidade

oral com o objetivo de determinar o número relativo de cópias dos genes DIA1, BIK, ECGF1 e PDGFB e dos marcadores D22S277 e D22S274 mapeados na região 22q13. Para todas as regiões amplificadas, 16/40 pacientes apresentaram perda da região 22q13.3, sendo que 10 casos apresentaram perda do marcador D22S274 (22q13.31). Todos os casos com perda para o marcador D22S274 apresentaram história familiar de câncer, sendo que, três casos tinham história de câncer de cólon na irmandade. Estes resultados sugeriram que a região 22q13 poderia conter um gene supressor de tumor envolvido na etiologia de carcinomas da cavidade oral.

A uma distância de 7 Kb do marcador D22S274 (22q13.31) encontra-se o gene recentemente descrito PHD finger protein 21B (PHF21B) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Baseados em estudos citogenéticos (Bérgamo et al., 2005) e moleculares (Poli-Frederico et al., 2000; Reis et al., 2002a; Reis et al., 2002b) prévios do nosso grupo que permitiram verificar uma associação significativa entre a perda da região 22q13.31, preferencialmente o locus D22S274, e história familiar de câncer em pacientes com CCECP, o objetivo deste estudo é investigar se o gene PHF21B é um gene de predisposição familiar relacionado aos carcinomas de cabeça e pescoço.

O Gene PHF21B

O gene PHF21B, também conhecido como PHF4, BHC80L ou FLJ34161, está mapeado em 22q13.31. Este gene é composto por 13 éxons, totalizando 128.539 pb (Figura 1).

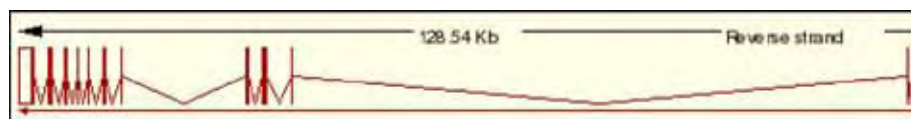


Figura 1. Diagrama mostrando a estrutura do gene (fita reversa). ([HTTP://www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

A região codificadora possui 1596 pb e codifica uma proteína de 531 aa, que contém um motivo PHD zinc finger de ligação ao DNA. Vários PHD fingers tem sido identificados como módulos de ligação da histona metilada H3.

O gene PHF21B possui, até o presente, 978 SNPs (polimorfismos de base única) cadastrados no banco de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP> em 08/07/2008). No entanto, um número reduzido de SNPs coincide em regiões de éxons. Entre os cinco SNPs mapeados em éxons, três são sinônimos (Figura 2, em verde) e encontram-se mapeados nos éxons 4, 7 e 10 e os dois SNPs mapeados nos éxons 3 e 4 (em vermelho, indicados na figura 2) são do tipo missense. A região 3'UTR (indicados em azul na figura 2) contém 16 SNPs não validados. Os SNPs dos éxons 3, 4 e 10 são validados. O SNP do éxon 7 não aparece no build 128 usado para a montagem da figura 15 pelo BLAT (<http://genome.brc.mcw.edu>), mas foi incluído no build 129 do dbSNP. A figura 2 apresenta esses achados em detalhes. A tabela 1 apresenta os resultados da análise de SNPs nas regiões de éxons do gene PHF21B.

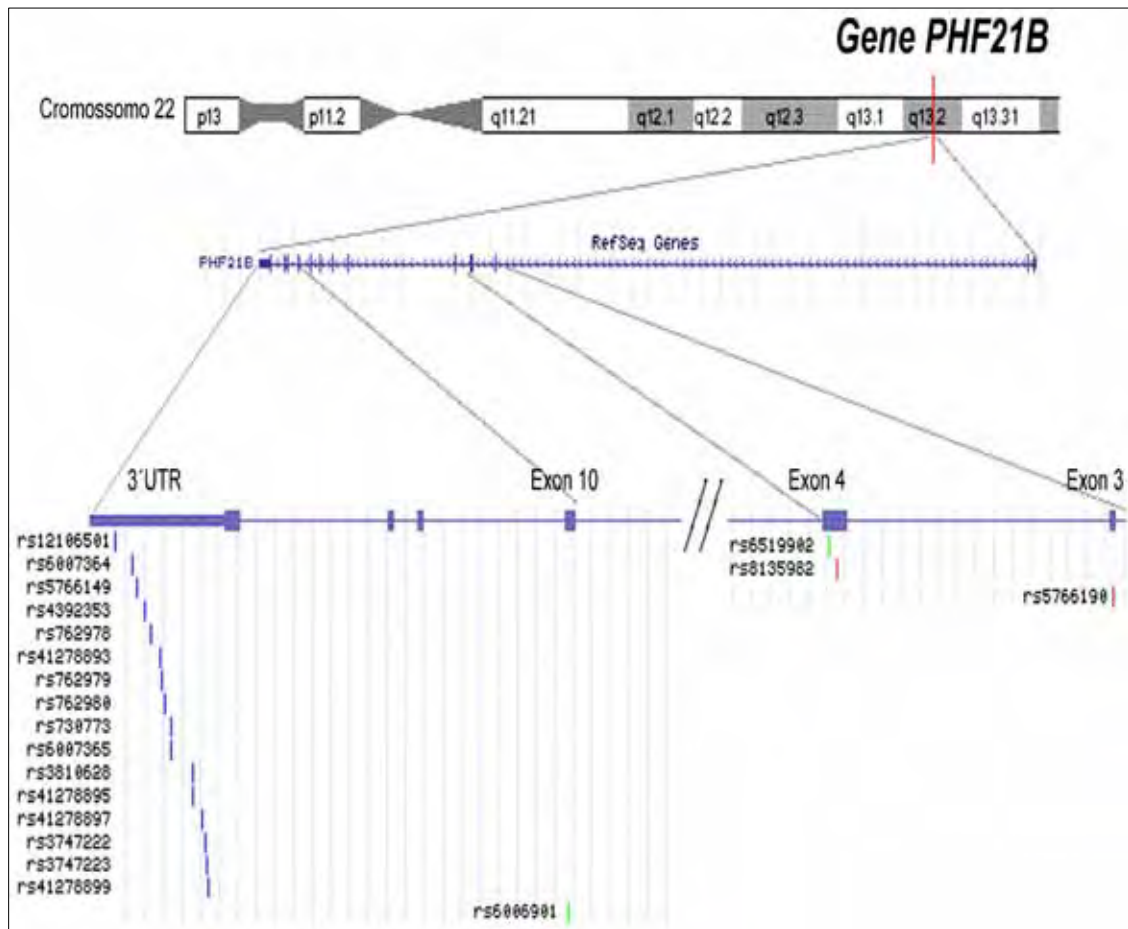


Figura 2. Diagrama esquemático do cromossomo 22, onde se mapeia o gene PHF21B indicando as regiões de SNPs. Os SNPs nos éxons 4, 7 e 10 são sinônimos (em verde; o SNP do éxon 7 não aparece no build 128 usado para a montagem da figura). Dois SNPs mapeados nos éxons 3 e 4 (em vermelho) são tipo missense. Os SNPs validados estão nos éxons 3, 4 e 10. A região 3'UTR apresenta 16 SNPs não validados.

Tabela 1. Polimorfismos de base única nas regiões de éxons do gene PHF21B (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP>).

Éxon	Posição no mRNA (nt)	dbSNP rs # cluster ID	Função	Alelo	Resíduo na Proteína	Posição no códon	Códon
éxon_10	1294	rs6006901	sinônimo	A	Pro [P]	3	381
			contig referência	G	Pro [P]		
	1294	rs59332971	sinônimo	A	Pro [P]	3	381
			contig referência	G	Pro [P]		
éxon_7	1048	rs59182297	sinônimo	A	Lys [K]	3	299
			contig referência	G	Lys [K]		
éxon_4	631	rs6519902	sinônimo	T	Ala [A]	3	160
			contig referência	C	Ala [A]		
	631	rs61376036	sinônimo	T	Ala [A]	3	160
			contig referência	C	Ala [A]		
	530	rs8135982	missense	A	Ser [S]	1	127
			contig referência	G	Gly [G]		
éxon_3	318	rs5766190	missense	A	Asn [N]	2	56
			contig referência	G	Ser [S]		

O gene PHF21B possui uma ilha de CpG com 3014pb, que se inicia na região promotora do gene (posição -995) e se estende pela 5' UTR, incluindo os éxons 1, 2 e 2853 nucleotídeos downstream. Este fragmento apresenta um conteúdo de CG igual a 68,2% e uma razão CpG observada/CpG esperada de 0,894, o que a qualifica como uma ilha de CpG segundo os critérios atualmente aceitos (fragmentos maiores que 500pb, conteúdo de CG maior que 55% e razão CpG obs/CpG esp maior que 0,65 - <http://cpgislands.usc.edu/>) (Figura 3).

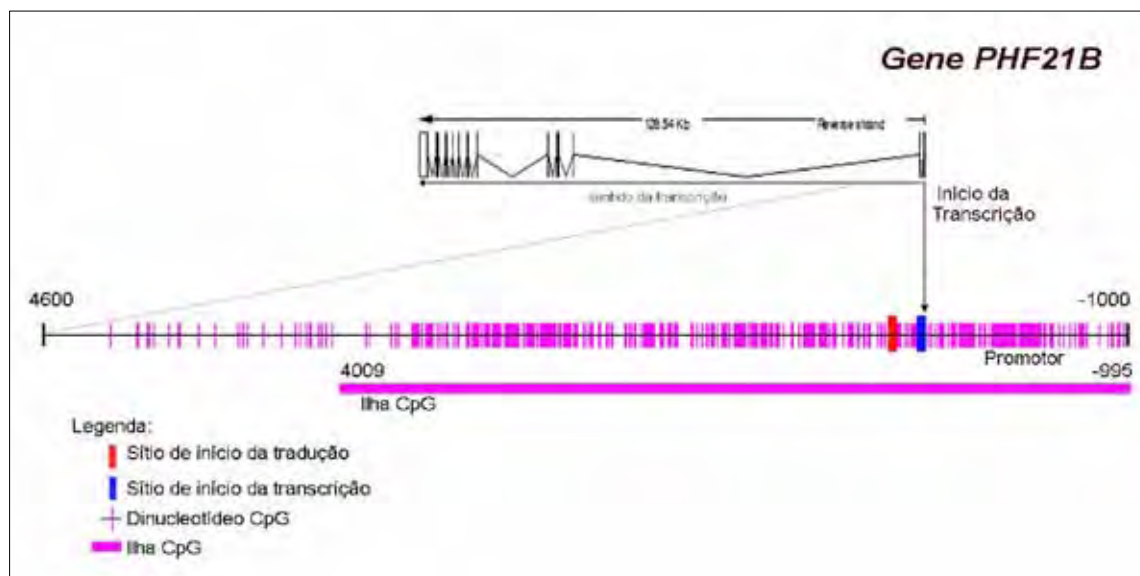


Figura 3. Representação esquemática do gene PHF21B e a ilha de CpG com 3014pb, que se inicia na região promotora do gene (posição -995) e se estende pela região 5' UTR.

Objetivo Geral

Investigar se o gene PHF21B é um gene de predisposição familiar relacionado ao desenvolvimento de CCECP.

Objetivos Específicos

✓ Avaliar as perdas no gene PHF21B em pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço baseado nos critérios de Amsterdam e Bethesda, definidos para pacientes com HNPCC;

✓ Pesquisar, por seqüenciamento direto, as possíveis mutações nos éxons 7, 8 e 9 do gene PHF21B nos pacientes portadores de CCECP, com história familiar positiva de câncer e que apresentaram perdas alélicas investigadas pela qPCR em tempo real;

Caracterização das Amostras

As amostras tumorais de pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço sem tratamento quimio e/ou radioterápico antes do procedimento cirúrgico são provenientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, SP. A casuística compreende 76 pacientes com CCECP, sendo que 35 destes pacientes pertencem a famílias com história de câncer de cabeça e pescoço e/ou outros tumores relacionados. As amostras foram coletadas após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes, o qual se encontra nos arquivos do referido hospital (Anexo 1). Os registros médicos de todos os pacientes foram examinados para obtenção de informações clínicas e histopatológicas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do referido hospital (CEP 792/2006) (Anexo 2).

A classificação histopatológica segue as recomendações da WHO International Classification of Diseases for Oncology (1990) e o estadiamento clínico foi determinado pelo sistema de estadiamento TNM (AJCC, 1998).

Imediatamente após a coleta, todos os fragmentos tumorais foram transferidos para nitrogênio líquido e mantidos a -70°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos. As amostras dos pacientes deste estudo encontram-se no banco de tumores do NeoGene Laboratório, Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo.

Pacientes

Com base nos critérios adotados em literatura (Amsterdam I - Vasen et al., 1991; Amsterdam II - Vasen et al., 1999 e Bethesda - Rodriguez-Bigas et al., 1997; Umar et al., 2004), previamente estabelecidos para HNPCC, este estudo incluiu os seguintes requisitos na avaliação de uma possível Síndrome de câncer familiar associada a tumores de cabeça e pescoço:

- Pelo menos dois afetados na família, parentes em primeiro grau, com câncer de cabeça e pescoço e/ou outro câncer associado (câncer mama, pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, cólon ou útero);
- Idade de aparecimento do câncer inferior a 56 anos, em pelo menos um dos afetados da família;
- Qualquer idade de aparecimento quando o afetado por CCECP não apresentar exposição ao tabaco e álcool ou outro fator etiológico bem conhecido.

Foi realizada a análise de prontuários dos pacientes, para a obtenção de dados clínicos e histopatológicos, história de câncer entre os familiares, além de: idade ao diagnóstico dos tumores; tratamento e evolução; exposições ambientais e fatores de risco conhecidos; parentes afetados; confirmação histológica dos exames anátomo-patológicos ou certificado de óbito em casos de parentes afetados por câncer.

O termo “câncer relacionado” foi adotado quando o parente afetado apresentava carcinomas de pulmão, mama, cólon e estômago. Essa designação foi utilizada baseada no levantamento de 252 pacientes do banco de amostras do

NeoGene Laboratório onde dados clínicos e epidemiológicos estavam completos em 134 casos. Nessa análise 52/134 pacientes apresentavam história de câncer na família e os principais tipos tumorais encontrados nos familiares após várias análises isoladas (incluindo análises em irmandades, mais de um parente afetado na família, hábitos tabagista e etilista, idade ao diagnóstico) eram tumores de cabeça e pescoço, estômago, pulmão, mama e cólon.

Os dados clínicos e histopatológicos dos 76 casos estão apresentados resumidamente na Tabela 2.

Tabela 2. Dados clínicos dos 76 pacientes com CCECP.

Características		Nº casos	%
Idade	≤ 56 anos	37	48.7
	> 56 anos	39	51.3
Gênero	Masculino	61	80.3
	Feminino	15	19.7
Localização	Boca	37	48.7
	Orofaringe	14	18.4
	Laringe	15	19.7
	Hipofaringe e outros	10	13.2
Tabaco	Sim	55	72.4
	Não	21	27.6
Álcool	Sim	49	64.5
	Não	27	35.5
Estadio T*	T1-T2	24	32.4
	T3-T4	50	67.6
Estadio N*	No	38	51.4
	N+	36	48.6
História Familiar	Sim	35	46.1
	Não	41	53.9
Evolução Clínica	Morto (pela doença ou não)	52	68.4
	Vivo (ou perda seguimento)	24	31.6

* disponível em 74 casos

Dentre os casos representados na Tabela 2, dez apresentam pelo menos dois parentes em primeiro grau afetados (carcinoma de cabeça e pescoço ou outro câncer relacionado), sendo que 6/10 apresentaram idade igual ou inferior a 56 anos quando do diagnóstico da doença. Há apenas três casos que não apresentam consumo de álcool e tabaco, sendo dois do sexo feminino e um do sexo masculino (este com idade inferior a 56 anos ao diagnóstico da doença).

A idade dos pacientes variou de 33 a 87 anos, apresentando mediana de 57 anos, média de 56,9 anos (desvio-padrão de 12,6 anos). O sexo masculino foi preferencialmente afetado numa razão de 4,07 homens para 1 mulher. Aproximadamente 72% dos pacientes eram fumantes e 64,5% eram etilistas. Foram classificados como [T1 + T2] 32,4% dos casos e como [T3 + T4], 67,6%.

Metodologia

Extração de DNA

O método de isolamento do DNA consistiu na digestão da amostra com proteinase K, extração das proteínas e dos ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) e precipitação com etanol 100%. Após a quantificação em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), o DNA extraído foi diluído a uma concentração de 10ng/uL e 100ng/uL para uso nas diferentes reações de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qPCR) e qualitativa (RT-PCR), respectivamente.

Análise Qualitativa pela RT-PCR

Para confirmar a presença/ausência de expressão do gene PHF21B (localizado em 22q13.31) a metodologia de RT-PCR foi realizada em diferentes amostras: tecidos normais adjacentes de cabeça e pescoço, gengiva normal, leiomiomas uterinos, linhagens celulares de fígado (HepG2), pulmão (H1155), cólon, cérebro (TG1G) e mama (MCF-7-F5 e MDA-M8-231). Após a síntese de cDNA, as amostras foram amplificadas pela PCR utilizando-se, separadamente, iniciadores para o gene - referência GAPDH (Housekeeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e PHF21B.

Para a etapa de extração do RNA total foi utilizado o Rneasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme as recomendações do fabricante. O RNA total, ressuspendido em 30 µL de água DEPC – Rnase free, foi acondicionado a -70°C. Para a etapa posterior de síntese de cDNA foi utilizado o sistema de pré-amplificação SuperScript™ II (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA).

As condições de ciclagem para a amplificação do gene GAPDH foram: 94°C-4min; 35 ciclos de: 94°C-30seg, 60°C-45seg, 72°C-45seg; 72°C-6min. As seqüências dos iniciadores utilizados foram: (F) 5'- CTGCACCACCAACTGCTTA-3' e (R) 5'-CATGACGGGAGGTCAGGTC-3'. As seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene PHF21B foram: (F): 5'-AAGAAGCAGCTCCACGAAAG-3' e (R): 5'-TGGCCTAACCTGAGGTAGCA-3', com as seguintes condições de reação: 94°C-5min; 35 ciclos de: 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min; 72°C-30min.

Com o intuito de confirmar se o produto gênico gerado pelas PCRs acima descritas correspondia à seqüência do gene PHF21B, foi realizado o seqüenciamento do produto da PCR da linhagem de carcinoma de mama MCF-7-

F5 e de uma amostra de tecido de gengiva normal de um indivíduo com ausência de tumor e de história familiar de câncer.

O produto da PCR foi utilizado como molde para as reações de seqüenciamento, com iniciadores que flanqueiam nas direções forward (5' - 3') e reverse (3' - 5') para os éxons 7-9. Para a amostra MCF-7-F5 foram feitas seis repetições (triplicatas forward e reverse) e para a amostra de gengiva normal foram feitas duas repetições (forward e reverse), de acordo com a quantidade de produto disponível para cada amostra.

Análise Quantitativa pela PCR em Tempo Real

Para a avaliação de ganhos ou perdas no gene PHF21B foi utilizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). As análises realizadas para a quantificação relativa das amostras de DNA foram feitas nos termocicladores automáticos ABI Prism 7000 e 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A fluorescência é capturada e coletada continuamente para cada amostra, entre 520 e 660 nm, e a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de DNA da amostra.

Os dados foram traduzidos por um software específico (Sequence Detection System software, versão 2.1, PE Applied Biosystems) e plotados em um gráfico (intensidade de fluorescência versus o número de ciclos). Quanto maior a quantidade de DNA - molde presente no início da reação, menor será o número de ciclos para a detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa. Este ponto é definido como limiar ou Ct (Threshold cycle) e ocorre

durante a fase exponencial de amplificação. Assim, cada amostra apresenta um valor de Ct específico.

A magnitude do sinal gerado (ΔR_n) é calculada pela fórmula: (R_n – Baseline), na qual R_n é a razão entre intensidade da emissão de fluorescência do corante e da referência passiva (ROX®) e baseline refere-se aos ciclos iniciais da PCR nos quais não há mudança significativa no sinal de fluorescência.

Para a detecção da fluorescência foram utilizados os corantes Platinum® SYBR® Green qRT-PCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), que apresentam alta especificidade de ligação à dupla fita de DNA.

A partir de pesquisas feitas em bases de dados internacionais (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.ensembl.org> e <http://genome.ucsc.edu/>), a sequência do gene PHF21B foi utilizada para o desenho dos iniciadores (Tabela 3), utilizando o software Primer Express (versão 2.0) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Dois conjuntos de iniciadores foram desenhados: um na região 3'UTR, por ser uma região conservada, e outro flanqueando o éxon 7. Esta segunda análise (no éxon 7) foi realizada posteriormente devido à existência de dois SNPs mapeados na região de anelamento do iniciador anti-senso para o éxon 13.

O gene GAPDH foi utilizado como gene - referência. Este gene, relatado como do tipo housekeeping, é comumente adotado em estudos de quantificação de DNA e mRNA de diferentes tipos de tumores e está mapeado em 12p13 (Thellin et al., 1999).

As reações foram processadas com amostras de DNA em concentrações de 10 ng/ μ L e 100 ng/ μ L, 10 μ M de cada iniciador e 12,5 μ L 2x Platinum® SYBR® Green/Power SYBR® Green. As condições de ciclagem para o éxon 13 foram: 50°C

por 2 min, 95°C por 10min e 40 ciclos a 95°C por 15s e 59°C a 1min. Para o éxon 7, as condições foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10min e 45 ciclos a 95°C por 15s e 60°C a 1min.

A presença de perda ou ganho do gene PHF21B nas amostras tumorais foi validada pela determinação da média e desvio padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para cinco amostras de tecidos normais. Este método normaliza a quantidade e a qualidade do DNA (Bustin, 2000). Além disso, as linhagens celulares KG-1a (#CCL 246-1), derivada de leucemia mielóide crônica, contendo a monossomia do cromossomo 22 e Hs 578T (#HTB 126), derivada de câncer de mama humano, contendo a trissomia do cromossomo 22 (American Type Culture Collection - ATCC- Rockville, MD, USA) foram utilizadas como controle interno da reação na avaliação de perdas e ganhos cromossômicos. As linhagens celulares foram cultivadas de acordo com as recomendações do ATCC para a confirmação de seus cariótipos. Foram usados como padrão e controle normal de amplificação DNA de placenta humana normal e DNA de referência normal (Human male/female Genomic DNA, Novagen).

Tabela 3. Descrição dos genes e das seqüências dos iniciadores utilizados na análise de qPCR em tempo real.

Gene	Localização	Seqüência	Tamanho (pb)
PHF21B éxon 13	22q13.31	5'-aaagacactgtcggaggtgagc-3' 3'-tcaaacggcaactacgcaa-5'	151
PHF21B éxon 7	22q13.31	5'-gctgagcacacagaggct-3' 3'-gggacttttctggaggct-5'	271
GAPDH	12p13	5'-gcaaccgggaaggaaatga-3' 3'-actgattgggacgcgagcag-5'	67

Análise de Mutação por Seqüenciamento Direto

A reação de seqüenciamento foi realizada pelo método de Sanger (Sanger et al., 1977). As análises foram feitas em dois modelos de seqüenciadores automáticos de DNA: o ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o ABI3130 (seqüenciador de capilar, 4 injeções, 36cm).

A análise de mutações no gene PHF21B foi investigada nos éxons 7, 8 e 9 em amostras normais e tumorais dos pacientes com CCECP que apresentavam história familiar de câncer e que mostraram perda da região genômica do éxon 13, avaliada pela qPCR. Os éxons 7, 8 e 9 foram selecionados por englobarem o domínio PHD-finger de ligação ao DNA (Figura 4).

O desenho dos iniciadores para cada um dos éxons propostos para estudo foi feito utilizando-se o software Primer Express® versão 2.0 (PE Applied Biosystems, Foster city, USA) e Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.Edu/primer3/input.htm>) (Figura 5). A seqüência do gene foi coletada e investigada nos bancos de dados como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>), UCSC ([http:// genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)). Após o desenho dos iniciadores, cada seqüência selecionada foi avaliada pela ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra a seqüência do gene para confirmação de identidade e alinhamento.

A

```

TCCCTTTTCGCTGTGGGGAGGAGCTCTCTCTCCCTCCCAACCCAGCCCGGAGGCTGCTTCCGCTCCGCTCCGCTCTG
GCCCCCGGAGCCCGGCACTTCCCGGAGCCCGGCAAACTGAGCTCCAAAGTCTCTCCCACTTCCGCTCCGCTATGGA
GCTGCAGAGCCCGGCGGAGGCGCTCGCGTGGAACTCGGCGGCCACCAAGAACGGGAGCTCAAGAAGCAGCTCCACGA
AAGGCAGCCCGGATCGCCGCGCTCAGGACAAACAAAGCTTTGGGAACGATCACTGCAGTGCCTGTCAAGGGTCTCTCA
GGTCAGCTCCTTGCAGAGTTTGGCCGGGCAAGGAGCGGAGTGTACCTCAGGTTAGGCCAAAGACTCTGATTCCAGA
CAGCCTCCCGCTTGGCCCGGCGGGAAGGGCCACCAAGCAGCCCCAACATTCCAGAAGGCCACCGTGGTCAGCGT
CAAGAACCCCGAGCCAGCCCTCCCCACGGCCAAACAACACTGTCAGCCATGTGCCAGCGCCGGCAGCCAGCCCGAGGC
CCTCGCGAGCCCGCGGCCCTCGCCTCTCCGCTGAGCAGTGGGGGGTGGCCTACGCCATCATCTCCACCTCCCCAG
CAATGCCCGCGCATGGCCCCAGCACCGCGTGTCTGTGGTCAGTGACAGCATCAAAGTCCAGCCCTCTCTCATCAG
TGCTGACAAACAGCCTCTCTCCAGCCTCTCTCTTCCCTCACCCCCGCAACCCATCACTGTCCCTCCACCCCTCTCTC
TCTTCCCTCACCCCTCTCTCCCATCACTGTCCCTTCCACCCCTCCATGGCATCTTCCAGGTTCATCATCATTCAGCC
TCAAGTGCAGAGCGCAGCCCGAGAGCACGGCAGAGTCCGCGCGCCGCGCACAGAGGAGCCATCTCAGGGAGCTCAGGCCAC
CAAAAAGAAGAAGGAAGACCGGCCCCGACCCAGGAGAAACCCGAGAAATCGCCTTCATGGTAGCGCTAGGCCCTGGT
TACCACGGAACATTTGGAAGAAATCCAGAGCAAGCGACAGGAGGGGAAGAGAGAGCAAGCTAACCTTCCCTACAG
CGCTCTCTGAGAGCCAGAGGAAGCCCTCTCTCCAACTATCTCAAACCCCTTGTTCCTCACAGGAGAGCCAA
TGAGGACCCCTCTGGAAGAACGAGATCACCAAGATGAGCACTGTGCCGCTGCAAGCGAGGGGCCAACCTGCAGCC
CTGCGGCACCTGCCCGGGGCTTACCACTCAGCTGCTGGAGCGCGCCCTCAAGAAGGCGCCCAAGGGCGTGTGGGT
GTGCCCAGGTGCCAGCAGAAGGCTTAAAGAAAGACGAGGCTGTGCCCTGGACTGGGATGCTGGGCATCGTGCACTC
TTATGTCAACCAACAGACAGTCAAAGAAGAGAGAGCAAGCTGCTGCAACGAGGCACTGAGCTGCAGAACCAGCA
CCAGCAGCTGGAGGAGCGGGACCGGGCGCTGGCGTCAGCAGTGCAGAAATGCCTGGAGTGAAGACAAGCCTGCTGGC
CGCCAGAGGGGCAACAGTCACTCCCTGGAACGCTGCGGGGCTCTGAGACTGATACAGGGCGAGCAGCTGCTCCA
GGTCACCATGACGACCACTAGCCTGCCCCACTGCTGGCCGGGCGCTGGACCAAGCCTCAGTGGCAGCCACACACCC
CACCTCCAGCACCCCGAGGCCACAACTGAACCCAGGGAACCTCTCATACCCAGGAAAGTTATTGGGACCTG
CTTACACAGCCTGGGGTTCCTGTCGGCTTAACTC...

```

B

```

MELQSRPEALAVELARHQNGDLKKQLHEROPRIAALSQKQALGTITAVPVTGPQVSSLQRLAQGA
AVLPQVRPKTLIPDSLPVAPGRDRPPKQPTTFQKATVSVKNPSPALPTAINTVSHVPAPGSPQAL
AEPALASPLSSAGVAYAIISTSPSNAAAHAPSTAVSVVSDSIKVQPLLISADNKPPLRLSSPAPA
THHCPLHPSSLPLTPPSPSLSPSLHGIFQVIIIQPVQTOPESTAESRPPTTEFSSQGAQATKKKE
DRPPTQENPEKIAFNVALGLVTTHELEEIQSKRQERKRSTANPAYSGLLETERKRLARNYLNPLF
LTARANEDPCWNEITHDEHCAACKRGANLQPCGTCPGAYHLSCLEPPLKTAPRGVWVCPRCQQAAL
EKDEGVPTGNLAIVHSVYTHKTVKEEEKQLLQSGSELQNEHQLEERDRLASAVQKCLELKTSL
LARQRGTQSSLDRLRALLRLIQEQLLQVTHNTTSPAPLLAGPNTKPSVAATHPTVQHPQGHN

```

Figura 4. A) Região codificadora do gene PHF21B. Os éxons são mostrados em azul e preto. A região em verde representa o domínio PHD zinc finger. B) Sequência da proteína codificada PHF21B. O mesmo domínio PHD zinc finger está destacado no retângulo em vermelho.

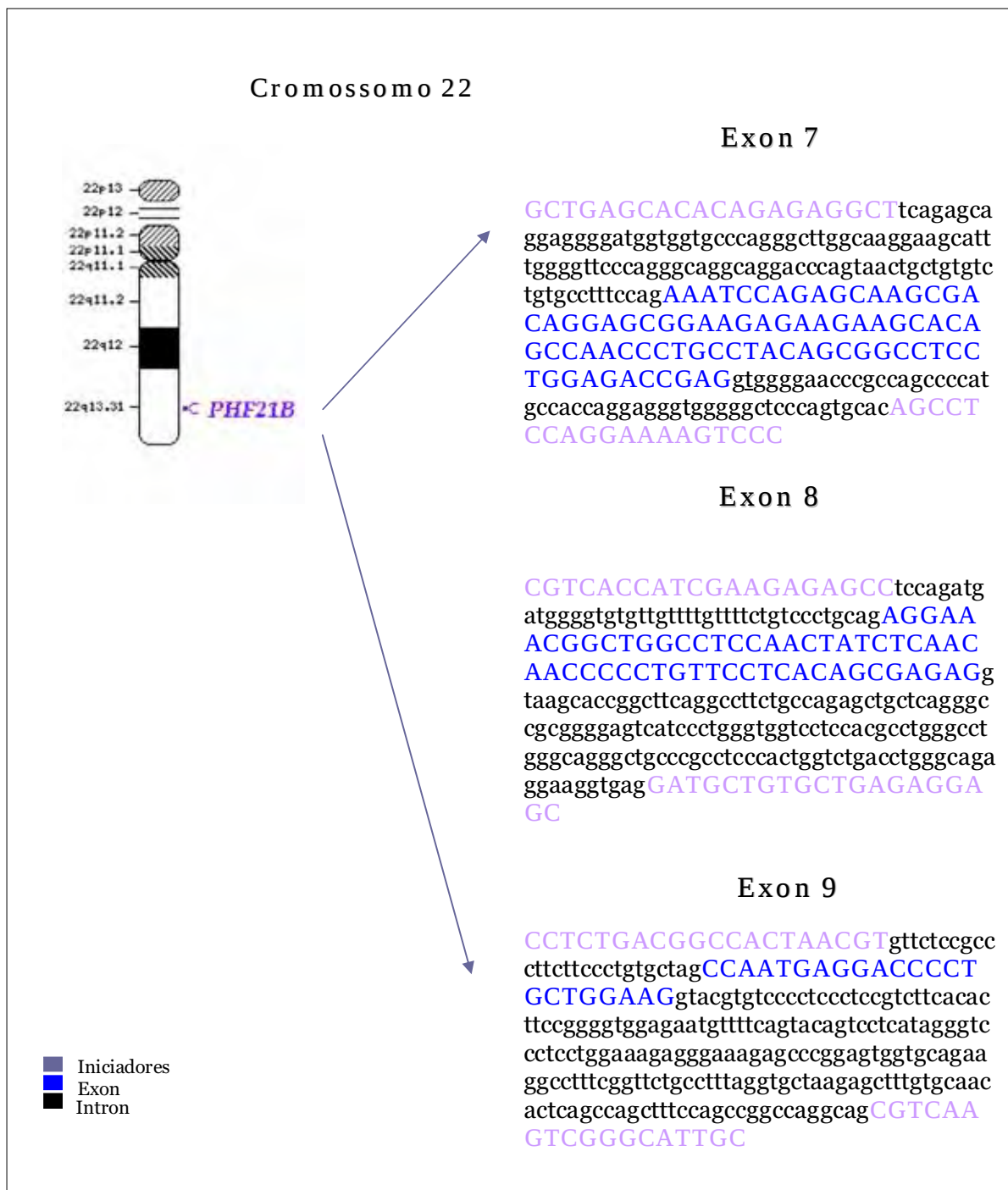


Figura 5. Representação esquemática dos éxons e a localização dos iniciadores para os éxons 7, 8 e 9.

Para as reações de amplificação pela PCR foi utilizada a enzima Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene, Agilent Technologies, USA), que apresenta alta fidelidade durante o processo de extensão. As condições gerais de reação foram: 95°C-2 min; 35 ciclos de: 95°C-20 seg, T°C-20 seg (onde T= temperatura de anelamento de 60°C, 60°C e 59°C para os éxons 7, 8 e 9, respectivamente), 72°C-20 seg; 72°C-3min.

Após a reação de amplificação, a quantidade e a qualidade dos produtos amplificados foram analisadas em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio (0,5 ug/ml) ou SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, USA) após eletroforese.

Os produtos da PCR que foram seqüenciados no seqüenciador automático de capilar ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA) foram anteriormente purificados pelas enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Cleveland, USA) e o produto final da purificação foi utilizado como molde para as reações de seqüenciamento.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados os reagentes: Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (contendo os dideoxynucleotídeos trifosfatados marcados com fluorescência), 10 µM de cada iniciador referente a cada éxon e que flanqueiam nas direções forward (5' – 3') e reverse (3' – 5'), tampão de diluição BDT v3.1 5X Sequencing Buffer (para o seqüenciador automático de capilar ABI3130) e o produto da PCR para cada amostra. Os iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento foram os mesmos utilizados na PCR (Figura 5).

A reação de precipitação foi realizada a partir do protocolo-padrão: isopropanol-etanol com alterações nas concentrações, de acordo com o seqüenciador automático utilizado, segundo o protocolo do fornecedor.

As amostras foram ressuspensas em 1,2µL blue dextran e/ou 15µL formamida e analisadas pelos seqüenciadores automáticos de DNA acima descritos. Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na região do laser scanner foi coletada e estocada pelos softwares: Data Collection v2.6, para o seqüenciador automático ABI Prism 377 e Run 3130 Data Collection v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA), para o seqüenciador automático de capilar ABI3130. Os dados foram analisados pelos softwares: Sequencing Analysis v3.4 e Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA), para os seqüenciadores automáticos ABI Prism 377 e ABI3130, respectivamente, nos quais cada intensidade de fluorescência é transformada em picos correspondentes aos nucleotídeos.

Os dados do seqüenciamento foram avaliados quanto a sua qualidade no software Phred/Phrap (<http://www.phrap.org>; Ewing e Green, 1998) e alinhados pelo software Clustal X 1.81 (Thompson et al., 1997). Somente foram consideradas na análise as seqüências que obtiverem similaridade com a região gênica esperada, quando analisadas pelo software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), e as seqüências que possuíram $\geq$ 90% das bases do fragmento seqüenciado apresentando um score de qualidade de no mínimo 20. Este score de qualidade é amplamente utilizado para se excluir artefatos do seqüenciamento e diminuir a probabilidade da determinação incorreta de bases, fundamental em pesquisas que envolvem a detecção de mutações.

Neste estudo, as seqüências de indivíduos normais foram agrupadas utilizando-se o software CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/new14.htm>). Este software combina, entre outros, os algoritmos Phred, Phrap e ClustalW (promovendo portanto a montagem dos contigs e

multialinhamentos). Dessa forma, o alinhamento das seqüências Normais (NI) gerou uma seqüência consenso (CNI). As discrepâncias entre os reads foram avaliadas pela matriz de qualidade gerada pelo algoritmo Phred (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e, em alguns casos com a análise dos cromatogramas. Não foram observadas discrepâncias nas seqüências dos indivíduos normais com qualidade >20, significando que as diferenças observadas entre os nucleotídeos das seqüências e a seqüência consenso tinham origem no seqüenciamento. Em seguida, a seqüência consenso NI foi comparada com seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) pelo algoritmo BlastN. Não foram observadas discrepâncias entre as seqüências.

Para a análise de mutação, cada seqüência forward e reverse oriunda dos tumores (TU) foram montadas utilizando o pacote Phred/Phrap. Essas seqüências foram então comparadas com as seqüências do GenBank, e alinhadas com a seqüência consenso pelo programa ClustalW. As discrepâncias observadas foram avaliadas pela análise da qualidade Phred e, em alguns casos, usando a análise dos cromatogramas com o auxílio do programa CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/new14.htm>) (Figura 6).



Figura 6. Exemplo de alinhamento das seqüências geradas, realizado pelo software CodonCode Aligner (www.codoncode.com/aligner/new14.htm).

Análise Estatística

A associação entre o número de cópias do gene PHF21B e as características clínico-patológicas foi feita utilizando-se o Teste exato de Fisher ou o Teste de Chi-Quadrado (teste de hipótese de frequências). Os tumores foram agrupados como T₁ e T₂ versus T₃ e T₄, assim como N₀ versus N₁, N₂, N₃ e N₄. Em todas as análises foram considerados 95% de significância ($p \leq 0,05$).

Análise Qualitativa de Expressão

A presença de expressão do gene GAPDH em diferentes amostras (tecidos normais de cabeça e pescoço, leiomiomas uterinos e linhagens celulares derivadas de hepatoma humano – HepG2, pulmão, cólon e cérebro – TG1G) foi confirmada após eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.

As mesmas amostras de cDNA foram amplificadas pela PCR para o gene PHF21B. Outras linhagens celulares de mama, normal e tumoral (FINO e FITO), MCF-7-F5 e MDA-M8-231 (derivadas de adenocarcinoma mamário humano) e amostra normal de gengiva foram incluídas no estudo. Após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% verificou-se a presença de uma banda de 156pb, confirmando a expressão do gene nos tecidos: normal de cabeça e pescoço, gengiva, leiomiomas uterinos, linhagens celulares de fígado, cérebro e mama (MCF-7-F5).

Com o intuito de confirmar se os produtos gênicos gerados pelas PCRs descritas acima correspondiam à sequência do gene PHF21B, foi realizado o seqüenciamento direto dos produtos da PCR das amostras MCF-7-F5 e gengiva normal.

Todo o produto da PCR disponível foi utilizado na reação: para a amostra MCF-7-F5 foram feitas seis repetições (triplicatas forward e reverse) e para a amostra de gengiva normal foram feitas duas repetições (forward e reverse). As seqüências obtidas foram alinhadas contra a seqüência genômica do gene PHF21B (RefSeqNM_138415) pelo programa BLAST2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

O resultado é apresentado em porcentagem de identidade com o cromossomo específico (no caso o cromossomo 22) e com o gene em estudo. As

seqüências apresentadas correspondem à obtida com a linhagem MCF-7-F5 (Figura 7).



Figura 7. Resultado do alinhamento da seqüência obtido com a linhagem MCF-7-F5 (Seq2) contra a seqüência do gene PHF21B (Seq1).

Análise Quantitativa pela PCR em Tempo Real

Após o desenho dos iniciadores para a região genômica 3'UTR do gene PHF21B (éxon 13), o DNA genômico de 76 pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço, dos quais 35 apresentam história de câncer na família, foi analisado pela PCR quantitativa em tempo real com o objetivo de se determinar o número relativo de cópias do gene PHF21B.

As linhagens celulares KG-1a (monossomia do cromossomo 22) e Hs578T (trissomia do cromossomo 22) foram utilizadas como controles na avaliação de perdas e ganhos genômicos. O intervalo de normalidade para os tecidos normais adjacentes (dissomia) variou de 0,78 a 1,28; para a linhagem celular KG-1a, o

intervalo variou de 0,52 a 0,69 e para a linhagem celular Hs578T, o intervalo variou de 1,46 a 1,73. O intervalo estabelecido para análise dos resultados foi de 0,69 a 1,46, que considera os limites superior e inferior das linhagens celulares com monossomia e trissomia, respectivamente. Baseado nesse intervalo foi observado que dos 76 casos analisados, 38 casos (50%) apresentaram padrão normal de amplificação, 10 casos (13,2%) apresentaram ganhos e em 28 casos (36,8%) foram detectadas perdas de seqüências para o gene PHF21B. O resultado da análise pela qPCR para as 76 amostras está apresentado na tabela 4.

Dos 28 casos com perda de seqüência, 20 apresentam história familiar positiva de câncer (independente do grau de parentesco ou o tipo de câncer diagnosticado no paciente), dos quais 17 apresentam história de câncer em parentes de primeiro grau. Seis casos apresentam pelo menos dois parentes afetados com câncer de cabeça e pescoço ou outros cânceres; um era não usuário de álcool e tabaco e sete casos apresentaram idade igual ou inferior a 56 anos ao diagnóstico da doença.

Entre os 38 casos que apresentaram padrão normal de amplificação, onze apresentam história positiva de câncer, sendo que cinco destes apresentam história de câncer em parentes de primeiro grau. Três casos apresentaram pelo menos dois parentes afetados com câncer; um caso não era usuário de álcool e tabaco e três casos apresentaram idade igual ou inferior a 56 anos ao diagnóstico.

Tabela 4. Resultados da análise de qPCR para o gene PHF21B em 76 amostras estudadas, considerando os valores limites dos intervalos observados nas linhagens com monossomia (0,52 a 0,69) e trissomia (1,46 a 1,73), ou seja, de 0,69 a 1,46. O tecido normal adjacente mostrou intervalo variando de 0,78 a 1,28.

Amostra	2 ^{Δ(-ΔΔCT)}	Status*
Cavidade oral		
SCP 54	1,81	●
SCP 124	0,38	o
SCP74	1,29	N
SCP92	0,97	N
SCP 40	1,62	●
SCP127	0,88	N
SCP133	0,68	o
SCP108	1,11	N
SCP78	1,28	N
SCP161	0,24	o
SCP48	0,38	o
326	0,79	N
SCP122	1,15	N
SCP84	0,43	o
SCP123	0,26	o
436	9,05	●
564	0,83	N
578	0,76	N
586	0,63	o
588	0,22	o
600	0,23	o
SCP27	0,81	N
339	0,63	o
565	0,81	N
581	0,61	o
SCP131	0,30	o
SCP23	0,81	N
65	1,04	N
208	1,13	N
336	1,23	N
349	1,12	N
398	0,99	N
547	0,65	N
BT878	0,89	N
BT881	0,95	N
BT1215	1,96	●
BT1287	1,17	N
BT1426	1,92	●
Faringe		
334	0,53	o
328	0,44	o
SCP99	0,48	o
SCP53	0,68	o
SCP98	0,64	o
SCP67	1,08	N
338	0,67	o
576	0,91	N
582	0,72	N
584	0,74	N
SCP38	0,57	o
SCP148	0,75	N
SCP50	1,44	N
605	1,04	N
606	0,65	o
638	1,01	N
640	1,09	N
114	1,20	N
261	1,33	N
348	1,27	N
BT1475	1,29	N
Laringe		
SCP66	1,59	●
SCP93	0,43	o
324	0,56	o
332	2,11	●
343	0,86	N
353	0,62	o
SCP146	0,34	o
331	0,67	o
575	2,94	●
585	1,15	N
587	1,21	N
579	0,86	N
583	1,53	●
603	0,03	o
637	0,46	o
72	1,60	●
212	0,37	o

*(●)Ganhos , (o) perdas e (N) normal.

Baseado nos critérios de Amsterdam I (Vasen et al., 1991), Amsterdam II (Vasen et al., 1999) e Bethesda, (Rodriguez-Bigas et al., 1997; Umar et al., 2004), para inclusão em uma possível síndrome de câncer familiar em CCECP, 57 casos (75%) foram incluídos em pelo menos um dos critérios e destes, 21 casos (36,8%) apresentaram dois dos critérios. Entre os 57 casos incluídos em pelo menos um dos critérios, 27 apresentaram padrão normal de amplificação e 22 mostraram perda do gene PHF21B.

Entre os 21 casos que foram caracterizados por dois dos critérios adotados na avaliação de uma síndrome de câncer familiar, 11 apresentaram padrão normal de amplificação, oito apresentaram perda do gene PHF21B. Os tipos de câncer envolvidos nas famílias incluem principalmente cabeça e pescoço (11 casos), cólon (5), estômago (5), pulmão (2), mama (5) entre outros mais raros.

Dezenove dos 76 casos analisados (25%) não preenchem os critérios adotados neste estudo. Contudo, em seis destes casos foi detectada a perda da sequência do gene PHF21B, sendo que um dos pacientes apresentava história de câncer na família em parentes de segundo grau. Onze dos 19 casos mostraram padrão normal de amplificação, sendo que três dos pacientes apresentavam história familiar de câncer em parentes de segundo grau.

A comparação entre as perdas genômicas e o sítio anatômico envolvido (boca, faringe, laringe, hipofaringe) não mostrou diferença significativa ($p = \text{NA}$). Da mesma forma, não foi encontrada associação estatisticamente significativa quando comparada a perda gênica com sexo ($p = 0.753$), estadió T ($p = 0.967$), N ($p = 0.766$), consumo de álcool ($p = 0.143$) e tabaco ($p = 0.012$). A associação com idade mostrou-se marginalmente significativa ($p = 0.0787$). A distribuição da casuística segundo os achados de perda gênica é apresentada na Tabela 5.

Os valores de quantificação relativa do gene PHF21B também foram utilizados na comparação entre o subgrupo de 35 e 41 pacientes com e sem história de câncer na família, respectivamente. A comparação revelou associação estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre a perda do gene PHF21B e a presença de história familiar de câncer em parentes de primeiro grau e os demais pacientes (indivíduos sem história de câncer familiar + indivíduos com segundo grau de parentesco com o caso índice). Quando a comparação foi feita entre pacientes com história de parentes de primeiro grau e aqueles sem qualquer história, também foi encontrada uma associação altamente significativa ($p < 0,0001$). Quando a comparação foi feita entre presença ou ausência de perda gênica e presença ou ausência de história familiar (qualquer grau de parentesco com o caso índice) foi mostrada uma associação estatisticamente significativa ($p = 0,001$). (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição casuística de acordo com os resultados de perda do gene PHF21B.

Variável	Categoria/Medidas	Perda do gene PHF21B		p-valor
		Não N (%)	Sim N (%)	
Sexo	F	10 (66.7)	5 (33.3)	0.753
	M	38 (62.3)	23 (37.7)	
Idade	N	48	28	0.0787 ^s
	Variação	33-76	39-87	
	Mediana	55.5	61.0	
	Média (desvio-padrão)	54.9 (12.1)	60.2 (13.0)	
Estadio T	T1 + T2	15 (62.5)	9 (37.5)	0.967
	T3 + T4	31 (62.0)	19 (38.0)	
Estadio N	No	23 (60.5)	15 (39.5)	0.766
	N+	23 (63.9)	13 (36.1)	
Tabaco	Não	18 (85.7)	3 (14.3)	0.012
	Sim / ex	30 (54.5)	25 (45.5)	
Álcool	Não	20 (74.1)	7 (25.9)	0.143
	Sim	28 (57.1)	21 (42.9)	
História Familiar	Não / 2º grau	40 (78.4)	11 (21.6)	<0.0001
	1º grau	8 (32.0)	17 (68.0)	
	Não	33 (80.5)	8 (19.5)	<0.0001
	1º grau	8 (32.0)	17 (68.0)	
	Não	33 (80.5)	8 (19.5)	0.001
	Sim	15 (42.9)	20 (57.1)	

p-valor obtido pelo teste Qui-quadrado; ^s p-valor obtido pelo teste t-Student.
Significativo p<0.05

Considerando-se que nos últimos tempos uma variedade de SNPs tem sido descrita em um número crescente de genes, uma análise cuidadosa foi realizada em toda a extensão do gene. Até o presente estão depositados 978 SNPs cadastrados no banco de dados dbSNP (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP>, aos 07/07/2008). Esta análise foi realizada com o objetivo de validar as prováveis alterações detectadas ao sequenciamento e

verificar a existência de SNPs nos sítios de pareamento dos iniciadores utilizados nas diferentes abordagens deste estudo.

Foi observado que o iniciador reverse do éxon 13 contém dois SNPs, conforme apresentado na Figura 8. O SNP rs6007365 não foi validado. O SNP rs730773 foi validado por frequência populacional em Afro-americanos, europeus, asiáticos e africanos (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> SNP, aos 11/07/2008).

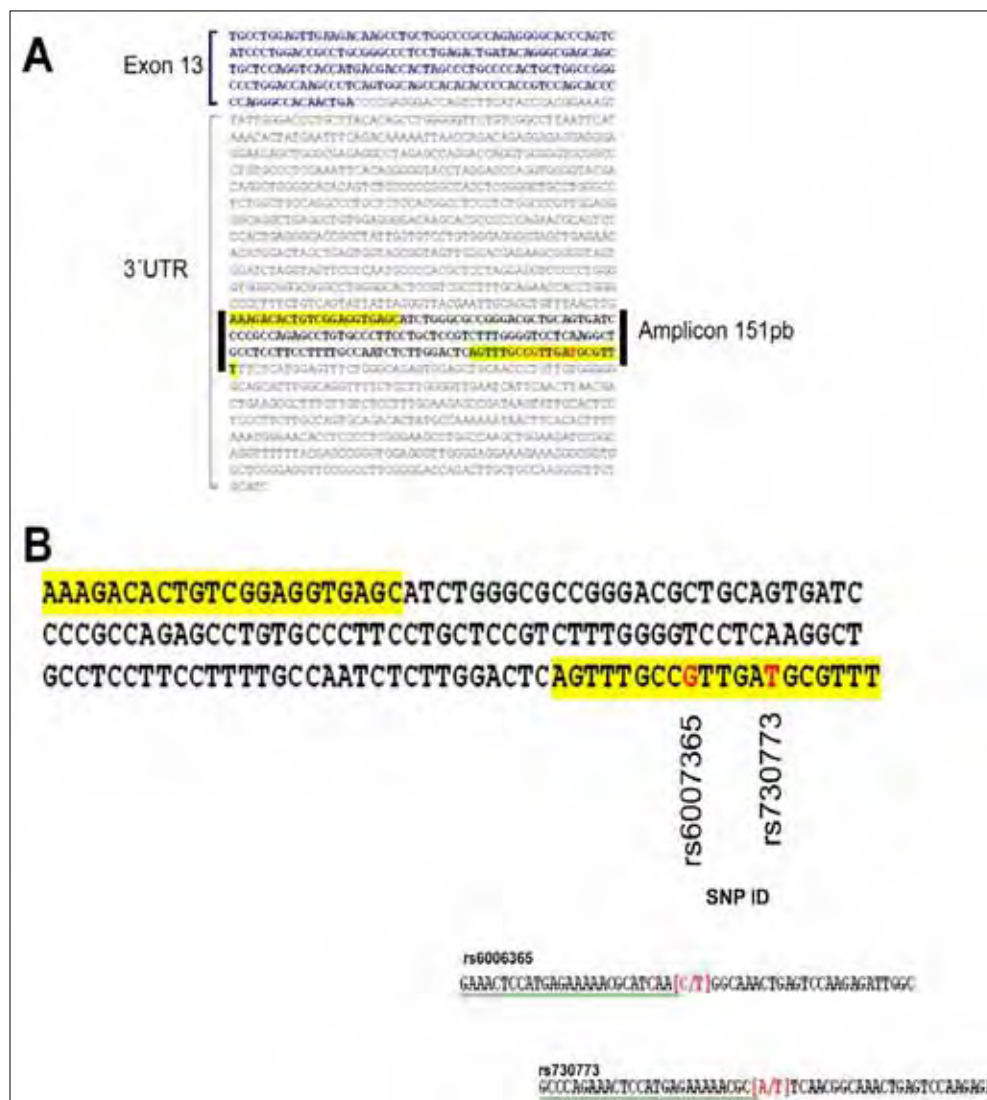


Figura 8. Diagrama esquemático de dois SNPs (rs6007365 e rs730773) identificados em um dos iniciadores (éxon 13) utilizados para avaliação de perdas do gene PHF21B, mapeados na região 3' UTR.

Baseado nestes dados, uma análise subsequente pela qPCR foi realizada com o objetivo de confirmar a presença de deleção deste gene, tendo como alvo o éxon 7, que não possui SNPs conhecidos na região de pareamentos dos iniciadores. Para tanto foram utilizados os mesmos iniciadores desenhados para o seqüenciamento do éxon 7.

Foram avaliados 44 dos 76 pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço, dos quais 16 apresentam história de câncer na família.

As linhagens celulares KG-1a (monossomia do cromossomo 22) e Hs578T (trissomia do cromossomo 22) também foram utilizadas como controles na avaliação de perdas e ganhos genômicos. O intervalo de normalidade para os tecidos normais adjacentes (dissomia) variou de 0,72 a 1,57; para a linhagem celular KG-1a, o intervalo variou de 0,64 a 0,84 e para a linhagem celular Hs578T, o intervalo variou de 0,78 a 1,29. Foi considerado o limite superior para perdas de 0,84 e para ganhos de 1,57, pois a variação detectada na linhagem controle Hs578T mostrou intervalos muito amplos. Baseado nesse intervalo foi observado que dos 44 casos analisados, sete casos (15,9%) apresentaram padrão normal de amplificação, cinco casos (11,4%) apresentaram ganhos e em 32 casos (72,7%) foram detectadas perdas do éxon 7 do gene PHF21B. O resultado da análise pela qPCR para as 44 amostras está apresentado na tabela 6.

A análise comparativa dos dados de qPCR nos 44 casos revelaram perdas concordantes para os éxons 7 e 13 em 13 casos; ganhos concordantes para os éxons 7 e 13 em um caso; normais concordantes para os éxons 7 e 13 também em um caso; 17 casos apresentaram perda para o éxon 7 e padrão normal de amplificação para o éxon 13; 5 casos apresentaram padrão normal de amplificação para o éxon 7 e perda para o éxon 13. Dados discordantes de ganhos para o éxon 7 e normal para

o éxon 13 foram observados em quatro casos; o inverso em um caso; dois casos mostraram perda para o éxon 7 e ganho para o éxon 13 (Tabela 7).

Tabela 6. Resultados da análise de qPCR para o gene PHF21B (éxon 7) em 44 amostras estudadas, considerando os valores limites dos intervalos observados nas linhagens com monossomia (0,64 a 0,84) e tecidos normais adjacentes (0,72 a 1,57), ou seja, de 0,84 a 1,57.

Amostra	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Status*
Cavidade oral		
SCP 54	2,86	●
SCP108	1,65	●
SCP122	0,32	o
SCP84	0,12	o
SCP123	0,82	o
564	2,83	●
578	0,27	o
586	0,53	o
588	0,38	o
600	0,52	o
339	1,20	N
565	0,19	o
581	1,11	N
65	0,66	o
336	0,00	o
349	0,54	o
547	0,42	o
BT881	0,36	o
BT1287	0,27	o
BT1426	1,18	N
Faringe		
334	0,98	N
328	0,36	o
SCP99	0,69	o
SCP98	0,93	N
338	0,00	o
576	0,66	o
SCP38	1,29	N
SCP50	1,10	N
605	0,54	o
606	0,36	o
638	0,66	o
640	1,97	●
114	0,00	o
261	10,02	●
348	0,00	o
Laringe		
SCP66	0,07	o
SCP93	0,01	o
343	0,01	o
585	0,17	o
587	0,02	o
583	0,14	o
603	0,00	o
637	0,32	o
212	0,25	o

*(●)Ganhos , (o) perdas e (N) normal.

Tabela 7. Resultados da análise de qPCR para o gene PHF21B para os éxons 7 e 13 em 44 amostras estudadas. (●) Ganhos, (o) perdas e (N) normal.

Amostra	Exon 7	Exon 13
Cavidade oral		
SCP 54	●	●
SCP108	●	N
SCP122	o	N
SCP84	o	o
SCP123	o	o
564	●	N
578	o	N
586	o	o
588	o	o
600	o	o
339	N	o
565	o	N
581	N	o
65	o	N
336	o	N
349	o	N
547	o	N
BT881	o	N
BT1287	o	N
BT1426	N	●
Faringe		
334	N	o
328	o	o
SCP99	o	o
SCP98	N	o
338	o	o
576	o	N
SCP38	N	o
SCP50	N	N
605	o	N
606	o	o
638	o	N
640	●	N
114	o	N
261	●	N
348	o	N
Laringe		
SCP66	o	●
SCP93	o	o
343	o	N
585	o	N
587	o	N
583	o	●
603	o	o
637	o	o
212	o	o

A análise estatística para o éxon 7 não foi realizada pelo pequeno número de casos que foram concordantes (15 em 44 casos) pelas duas análises e pelo fato de não haver informações sobre o seqüenciamento do éxon 7 para esses casos. A análise de qPCR foi realizada com o intuito de confirmar e validar pelo menos um subgrupo de amostras em que foram detectadas perdas para o éxon 13.

Baseado nos critérios de Amsterdam I (Vasen et al., 1991), Amsterdam II (Vasen et al., 1999) e Bethesda, (Rodriguez-Bigas et al., 1997; Umar et al., 2004), para inclusão em uma possível síndrome de câncer familiar em CCECP, 33 casos (75%) foram incluídos em pelo menos um dos critérios e destes, 14 casos (42,4%) apresentaram dois dos critérios. Entre os 33 casos incluídos em pelo menos um dos critérios, seis apresentaram padrão normal de amplificação e 24 mostraram perda do gene PHF21B.

Entre os 14 casos que foram caracterizados por dois dos critérios adotados na avaliação de uma síndrome de câncer familiar, dois apresentaram padrão normal de amplificação, dez apresentaram perda do gene PHF21B. Os tipos de câncer envolvidos nas famílias incluem principalmente cabeça e pescoço (3 casos), cólon (1), pulmão (1), mama (4) e esôfago (3).

Onze dos 44 casos analisados (25%) não preenchiam os critérios adotados neste estudo. Contudo, em oito destes casos foi detectada a perda da seqüência do gene PHF21B. Um caso mostrou padrão normal de amplificação.

Seqüenciamento Direto do Gene PHF21B

Com o objetivo de identificar possíveis mutações em ponto no gene PHF21B, foi realizado o seqüenciamento direto de três éxons em amostras normais

e tumorais de 27 pacientes com CCECP (éxons 7, 8 e 9). A qualidade dos produtos amplificados foi visualizada em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídio (0,5 ug/ml) ou SYBR Safe DNA gel stain (10.000X concentrado em DMSO) (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Os produtos das reações foram utilizados para o seqüenciamento direto. As seqüências obtidas após o seqüenciamento automático foram analisadas pelo software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Somente as seqüências que apresentaram similaridade com a região gênica esperada foram consideradas confiáveis (Figura 9 e 10).

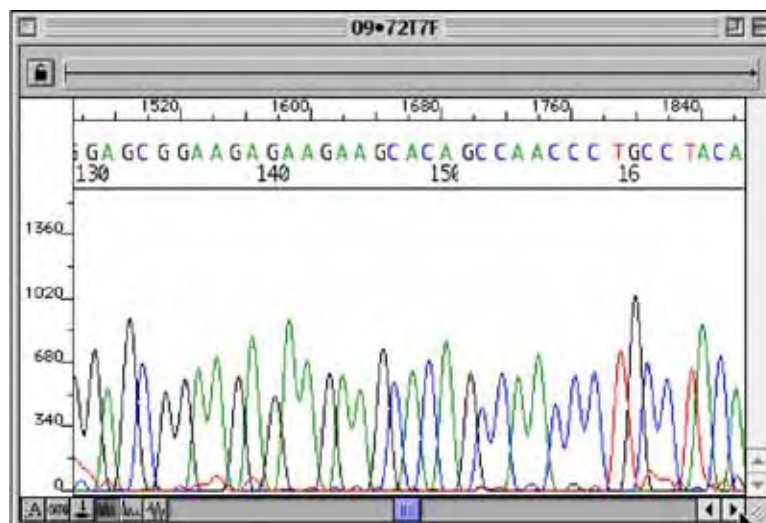


Figura 9. Eletroferograma gerado para a amostra 72T (fita forward para o éxon 7).

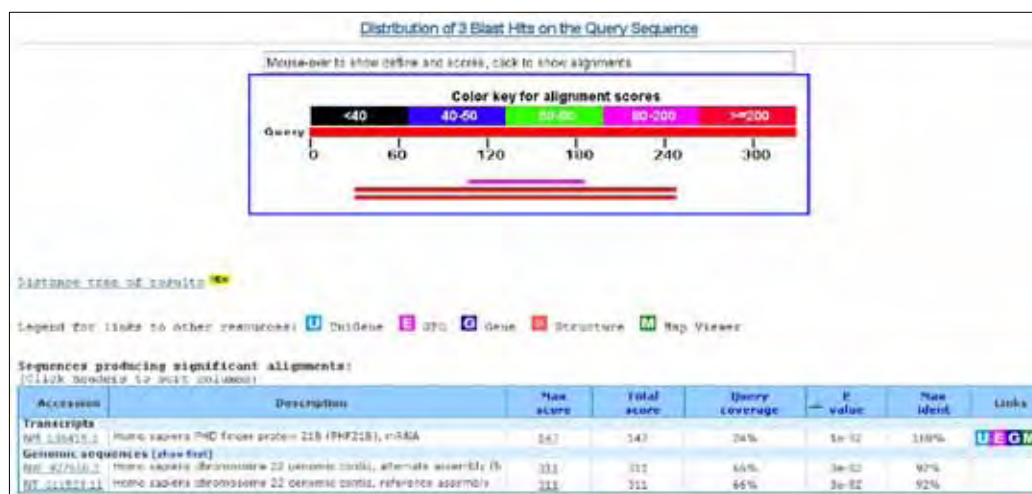


Figura 10. Resultado do alinhamento realizado pelo BLAST para a amostra 72T (fita forward para o éxon 7). A seta vermelha indica o alinhamento exato com o gene em estudo (PHF21B), com 100% de identidade.

Todas as seqüências geradas e analisadas pelo BLAST foram avaliadas e alinhadas pelos programas Phred (Ewing e Green, 1998), Phrap (<http://www.phrap.org>; Gordon et al., 2001) e Clustal X 1.81 (Thompson et al., 1997) na busca por possíveis mutações nos éxons estudados. Foi estabelecida uma seqüência consenso (qualidade Phred >20) utilizando o software CodonCode Aligner. As seqüências consenso Normal e Tumoral foram alinhadas no Clustal X, e as desigualdades foram observadas manualmente nos cromatogramas. A análise das seqüências foi realizada com a colaboração do Dr. Vicente Eugênio de Rosa Junior (Centro da Cana, Instituto Agrônomo de Campinas, Ribeirão Preto, SP).

Após a análise completa dos éxons 7, 8 e 9, não foram observadas alterações, exceto as variações indicadas na figura 11, que foram detectadas na região intrônica do éxon 7 (probabilidade <1% de serem reais).

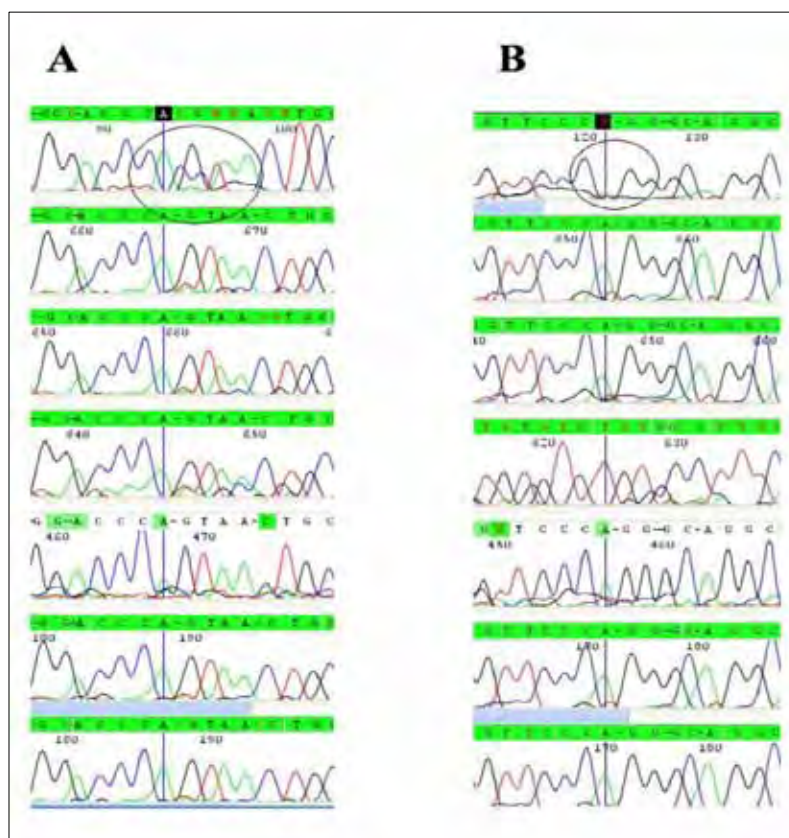


Figura 11. Resultados da análise de seqüenciamento do éxon 7, cujos iniciadores flanqueiam regiões intrônicas. Foram detectadas duas variações intrônicas (indicadas em círculo no alto do cromatograma), provavelmente originadas da qualidade do seqüenciamento.

Discussão

A presença de um componente genético envolvido na predisposição familiar ao câncer é evidenciada pela ocorrência de agregação de tipos particulares de tumores em famílias. Embora vários estudos relatem agrupamentos familiares de câncer como um possível fator de risco em tumores de cabeça e pescoço os resultados são inconclusivos e raramente exploram os dados em detalhes.

O gene PHF21B (PHD finger protein 21B) foi inicialmente caracterizado pelo programa The National Institutes of Health Mammalian Gene Collection (MGC), um esforço multi-institucional para identificar e seqüenciar clones de cDNA contendo ORFs (open reading frame) completas de genes humanos e de camundongo. Neste projeto, ESTs (expressed sequence tags) foram geradas a partir de bibliotecas enriquecidas com full-length cDNAs e posteriormente analisadas pelo seqüenciamento com alto grau de acurácia, para a obtenção de full-ORF clones. O clone correspondente ao gene PHF21B foi identificado como BCo12187 (Mammalian Gene Collection, MGC, Program Team, 2002). Posteriormente, estes dados foram compilados, anotados e disponibilizados em bancos públicos (The Mammalian Gene Collection, MGC, 2004; Collins et al., 2004). Estes dados *in silico* constituíram a base para o delineamento de todos os ensaios realizados no presente estudo e a falta de dados em literatura sobre ensaios laboratoriais explica, em parte, as dificuldades encontradas especialmente quanto à falta de caracterização completa das variantes alélicas deste gene em diferentes populações e ensaios funcionais.

Estudos adicionais são fundamentais para determinar a função deste gene que codifica um fator transcricional com um domínio PHD zinc finger. As

proteínas zinc fingers variam amplamente na estrutura, bem como na sua função, por interações de ligação DNA/RNA para proteína-proteína e associação de membrana. O termo zinc finger é amplamente utilizado para identificar qualquer estrutura compacta que é estabilizada por íons de zinco, o qual desempenha um papel estrutural. Estas proteínas podem estar envolvidas nos processos de duplicação e reparo, transcrição, metabolismo e sinalização, proliferação celular e apoptose (Krishna et al., 2003). A função da proteína PHF21B ainda não foi totalmente caracterizada.

O gene PHF21B foi anteriormente denominado de PHF4, BHC80L, FLJ34161 e é altamente conservado. Já foram caracterizados ortólogos em diferentes espécies como *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Rattus norvegicus*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris* e *Equus caballus*. Em tecidos humanos, ESTs deste gene foram identificadas a partir de fontes diferentes incluindo cérebro, testículos, olhos, pâncreas, tecido embrionário, pulmonar, da glândula pineal e medula óssea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?UGID=170491&TAXID=9606&SEARCH=>, aos 12/07/2008). Além desses tecidos, o presente estudo demonstrou a expressão deste gene em tecido normal de gengiva e em linhagens celulares estabelecidas de tumores mamários, hepatoma e cólon, bem como em tumores primários de cabeça e pescoço e em leiomiomas uterinos. Estes dados indicam um amplo espectro de distribuição e expressão do gene.

Vários domínios PHD foram associados a proteínas contendo módulos de ligação a histona H3 metiladas nos resíduos de lisina (Bienz, 2006; Mellor, 2006; Li et al., 2007). Recentemente, a proteína BHC80 foi identificada como parte de um complexo BRAF-HDAC (BHC) que possui um importante papel na repressão de genes tecido-específico (Iwase et al., 2004). Acredita-se que os domínios PHD

fingers podem interagir simultaneamente com os nucleossomos e proteínas específicas em multi-complexos, efetuando a leitura do código das histonas. Desta forma, teriam um papel fundamental na regulação epigenética da expressão gênica.

O gene PHF21B foi selecionado como candidato a gene de predisposição a cânceres de cabeça e pescoço baseado em estudos citogenéticos (Bergamo et al, 2005), de perda de heterozigose (Poli-Frederico et al., 2000; Reis et al., 2002a) e de perda de alelos em 22q por qPCR (Reis et al., 2002b) em amostras de pacientes Brasileiros que revelaram associações com história familiar. Alterações genômicas consistentes envolvendo 22q13.31 levaram a identificação do gene PHF21B que está mapeado a 7Kb do marcador D22S274 como possível candidato a supressor tumoral relacionado a predisposição hereditária ao câncer de cabeça e pescoço.

Estudos do tipo caso-controle desenvolvidos por Cooper et al. (1995) e Foulkes et al. (1995; 1996) mostraram proporções significativas do risco relativo de desenvolver carcinoma de cabeça e pescoço em parentes de primeiro grau (RR: 3,4-3,79). Este valor aumentava mais de duas vezes quando um irmão desenvolvia a doença (RR: 8,57-14,6). Entretanto, Goldstein et al. (1994) encontraram um risco relativo diferente em famílias com carcinoma oral (RR: 1,2) e de faringe (RR: 1,7).

Entre os 76 pacientes do presente estudo, em 11 casos foi observada a presença de história de câncer de cabeça e pescoço, sendo que 6 deles eram parentes de primeiro grau do probando (dois de laringe, quatro de cavidade oral). Outros tipos de câncer envolvidos nas famílias incluem principalmente cólon (cinco casos, sendo quatro em parentes de primeiro grau), estômago (cinco casos, sendo um em parente de primeiro grau), pulmão (dois casos em parentes de primeiro grau) e mama (cinco casos em parentes de primeiro grau, sendo que em um deles o probando apresentava irmãs e tias afetadas).

Estes pacientes foram selecionados e avaliados quanto a perdas do gene PHF21B por qPCR para o éxon 13. O éxon 13 foi inicialmente selecionado por não apresentar SNPs, estar mapeado na região 3' UTR do gene e não estar relacionado ao domínio de ligação PHD. Nesta casuística, foi observado que dos 17 pacientes com história de câncer em parentes de primeiro grau e perda para a região genômica do éxon 13 do gene PHF21B, 12 apresentaram câncer na irmandade.

Embora a maioria dos casos de CCECP apresente mutações somáticas em genes supressores tumorais, Lange et al. (2002) detectaram um caso com uma provável mutação na linhagem germinativa no gene TP16. Um estudo de Yu et al. (2002) relatou uma família com alta incidência de CCECP e melanoma associados com uma mutação na linhagem germinativa no éxon 2 do gene TP16. Os autores sugeriram que, nesta família, houve uma relação causal entre a mutação e a gênese dos carcinomas de cabeça e pescoço e que, portanto, o CCECP familiar deveria ser incluído como uma nova entidade dentro do conjunto de cânceres hereditários relacionados às mutações no gene TP16.

Em outro estudo (Jefferies et al., 2001), foi investigada a mesma mutação na linhagem germinativa de 40 pacientes com CCECP e um segundo tumor primário. A ausência de mutações no gene TP16 levou a sugestão de que este gene não possui um papel preponderante na predisposição ao CCECP nestes pacientes. Para o nosso conhecimento, não há relatos de outro provável gene de predisposição que poderia estar envolvido na etiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço. Os dados do presente estudo mostraram que a deleção do gene PHF21B está significativamente associada a pacientes com história familiar de câncer em parentes de primeiro grau, qualificando-o como um novo candidato à predisposição ao desenvolvimento de CCECP.

Baseado nos critérios de Amsterdam I (Vasen et al., 1991), Amsterdam II (Vasen et al., 1999) e Bethesda, (Rodriguez-Bigas et al., 1997; Umar et al., 2004), para inclusão em uma possível síndrome de câncer familiar em CCECP, 57 casos (75%) primeiramente analisados para o éxon 13, foram incluídos em, no mínimo, um dos critérios e destes, 21 casos (36.8%) apresentaram dois dos critérios. Dezenove dos 76 casos analisados (25%) não foram categorizados nos critérios adotados neste estudo, entretanto, seis casos apresentaram perda da sequência do gene PHF21B, sendo que um dos pacientes apresentava história de câncer na família em parentes de segundo grau. Uma possibilidade é o envolvimento deste gene em cânceres esporádicos.

Entre os 57 casos que se enquadravam nos critérios adotados neste estudo, 22 mostraram perda para o gene para a região genômica do éxon 13. Entre os 21 casos que se enquadravam em pelo menos dois dos critérios adotados, oito apresentaram perda do gene PHF21B e história familiar de câncer em parentes de primeiro grau. Um destes pacientes apresentava as seguintes características: sexo feminino, não usuária de álcool ou tabaco e história de irmão com câncer de pulmão. Sete pacientes apresentaram idade igual ou inferior a 56 anos ao diagnóstico da doença. Dois destes casos foram avaliados previamente por métodos citogenéticos e mostraram perda do cromossomo 22 nas células tumorais (Bérgamo et al., 2005), confirmando este achado. Um deles era do sexo masculino, apresentava 45 anos ao diagnóstico, e história de irmãs e tias com câncer de mama. Um outro caso apresentava história familiar de pai com câncer de laringe, irmã com câncer de mama e irmãos com câncer de pulmão.

Entre os 11 casos que apresentaram padrão normal de amplificação para o éxon 13 do gene PHF21B, 10 apresentaram idade igual ou inferior a 56 anos ao diagnóstico, oito não fumavam ou bebiam e quatro apresentaram história familiar

de câncer em primeiro grau. Entre os não-fumantes e não-consumidores de álcool, uma paciente (SCP127) de 74 anos era não consumidora de álcool ou tabaco e pai com história de melanoma. Este caso seria interessante ser avaliado para mutações no gene TP16, como proposto por Yu et al. (2002).

Outra abordagem usada neste estudo foi a investigação de SNPs publicados em bancos de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), onde se mapeiam os iniciadores usados neste estudo na avaliação de perdas ou mutações do gene PHF21B. A presença de SNPs nos iniciadores poderia resultar na detecção de diminuição de seqüências do DNA por ausência de pareamento ou pareamento ineficaz e levar a falsos resultados, quando da investigação de perdas. Dois SNPs mapeiam-se na região de um dos iniciadores aqui utilizados. O SNP rs730773 encontra-se validado em alguns indivíduos na database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, incluindo europeus, africanos e asiáticos. Ao iniciar este estudo, não havia qualquer informação em literatura ou bancos de dados sobre o gene PHF21B. Vale ressaltar que ao início deste estudo esses SNPs não haviam sido identificados e publicados. Embora o achado deste SNP não invalide os resultados deste estudo, pela localização das bases no iniciador e porque os alelos variantes freqüentemente estão em uma pequena proporção de casos, foi realizada uma análise do éxon 7 em um subconjunto de amostras.

Na análise do éxon 7 foram investigadas 44 amostras para perdas genômicas e os resultados foram comparados com as mesmas amostras investigadas para o éxon 13. Nestes casos não há dados referentes ao seqüenciamento do éxon 7. Assim, não é possível excluir outras alterações nestas seqüências. Essa abordagem foi realizada apenas como ferramenta para confirmação dos dados em um subconjunto das amostras. Trinta e três destes casos (75%) foram incluídos em ao menos um dos critérios adotados na avaliação

de uma síndrome de câncer familiar e destes, 14 casos (42,4%) apresentaram dois dos critérios. A análise dos dois éxons avaliados mostrou consistência para perdas em 13 casos para os dois éxons; ganho e normalidade foram observados em concordância em um caso cada. Resultados discrepantes foram observados em 29 amostras. Cinco casos apresentaram padrão normal para o éxon 7 e deleção no éxon 13. A possível explicação para esses casos seria que a presença de SNPs no local de pareamento dos iniciadores (éxon 13) que poderia resultar na perda da eficiência de amplificação de seqüências do DNA por ausência de pareamento ou pareamento ineficaz e levar a falsos resultados (perdas). Outra discrepância (entre os 29 casos) refere-se a 17 amostras que mostraram perdas para o éxon 7 e normalidade para o éxon 13. Este dado poderia ser explicado pela ocorrência de pequenas deleções intragênicas restritas a este éxon. Vale ressaltar que o gene possui éxons extremamente reduzidos, separados por íntrons extensos e que o éxon 7 dista aproximadamente 10Kb do éxon 13. Entretanto, este resultado necessita de novas análises para confirmação, incluindo o seqüenciamento de todo o gene. Os demais casos discrepantes (sete casos), envolvendo ganhos e normalidade ou perdas e ganhos, precisam ser reavaliados, pois a explicação mais plausível poderia estar relacionada a variações no número de cópias, recentemente relatada como freqüente em diferentes regiões do genoma eucromático humano (copy number variation – CNV), incluindo o cromossomo 22 (Tuzun et al., 2005; Scherer et al., 2007).

A perda consistente de regiões do gene PHF21B detectada no DNA genômico de células tumorais, sugere que este seria um novo candidato a gene supressor tumoral envolvido no CCECP. Considerando-se a associação entre deleções do cromossomo 22 e história familiar de câncer em estudos prévios do nosso grupo e os dados do presente estudo, a hipótese de “two-hits” para a

inativação de supressores tumorais (Knudson, 1971) foi testada na presente casuística pela análise combinada de deleções do gene PHF21B por qPCR e pesquisa de mutações em pontos por seqüenciamento direto. Segundo este modelo, mecanismos genéticos (deleções, mutações etc) levariam à inativação de ambos os alelos do gene, sendo que o primeiro ocorreria na linhagem germinativa e seria herdado e o segundo seria adquirido na linhagem somática.

Três éxons relacionados com a região PHD zinc finger foram selecionados para investigação de mutações em ponto e conseqüente inativação funcional. Os éxons 7, 8 e 9 foram completamente investigados e não foram detectadas variações significativas que pudessem definir mutações na linhagem germinativa incluindo possíveis novos SNPs ou mutações somáticas tumor-específicas. Desta forma, nenhum caso com deleção do gene PHF21B mostrou mutações concomitantes nos três éxons investigados.

Embora não se possa excluir a presença de mutações nos demais éxons, mecanismos alternativos de inativação de genes supressores tumorais, como as alterações epigenéticas e, especialmente, a hipermetilação da região promotora deste gene deveria ser investigada em estudos futuros (Esteller, 2008).

Esta hipótese é corroborada pela estrutura do gene PHF21B cuja região promotora, a 5' UTR e os primeiros éxons contém uma ilha de CpG que constitui um potencial alvo de metilação aberrante. Numa análise preliminar foi confirmada a presença da ilha de CpG caracterizada por uma razão observada/esperada de CpG de 0,894 em um fragmento de 3014pb. Atualmente é aceito como critério na avaliação de ilhas de CpG, fragmentos >500pb e a razão observada/esperada >0,65 (Takai e Jones, 2002)

Embora os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço sejam histologicamente iguais, a etiologia e prognóstico são diferentes em cada um

desses sítios (Hunter et al., 2005). Isto é observado na diferença em relação ao padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico entre as diferentes localizações anatômicas (Takes et al., 1998; Chin et al., 2004). Entretanto, no presente estudo não foi observada uma diferença significativa na comparação entre os diferentes sítios anatômicos com relação à presença ou ausência de perdas de seqüência de PHF21B.

Apesar do achado inesperado de SNPs na região de um dos iniciadores, os resultados apresentados indicam uma associação significativa entre as perdas genômicas em PHF21B nos pacientes com história familiar positiva de câncer e é um forte indicador de ser um gene relacionado a uma nova síndrome de câncer familiar em CCECP. Estudos adicionais são essenciais para definir o papel do gene PHF21B em cânceres de cabeça e pescoço e sua possível ação como supressor tumoral.

- As deleções investigadas no éxon 13 do gene PHF21B estavam significativamente associadas à presença de história familiar de câncer em parentes de primeiro grau, quando comparada aos demais pacientes (indivíduos sem história de câncer familiar + indivíduos com segundo grau de parentesco com o caso índice) ($p < 0,0001$);
- A correlação entre pacientes com história de parentes de primeiro grau e aqueles sem qualquer história também se mostrou altamente significativa ($p < 0,0001$);
- Foi observada associação estatisticamente significativa quando a comparação foi feita entre presença ou ausência de perda gênica e presença ou ausência de história familiar (qualquer grau de parentesco com o caso índice) ($p = 0,001$);
- Em um subgrupo das amostras foi observada a perda concomitante para os éxons 7 e 13;
- Os éxons 7, 8 e 9 do gene não apresentaram mutações ou outras alterações que pudessem ser detectadas ao seqüenciamento direto, o que não invalida os achados obtidos pela análise de qPCR em tempo real;
- É necessária uma análise aprofundada de todos os éxons e junções éxon/intron do gene PHF21B, assim como o delineamento de outras abordagens que permitam a identificação do primeiro evento mutacional no contexto de uma síndrome de câncer hereditário.

- AJCC, AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott: 1998.
- ALBERG AJ, CHEN JC, ZHAO H, HOFFMAN SC, COMSTOCK GW, HELZLSouer KJ. Household exposure to passive cigarette smoking and serum micronutrient concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2(6): 1576-82, 2000.
- ALBERTINI RJ. Biomarkers responses in human populations: towards a worldwide map. *Mutation Research*. 428:217–226, 1999.
- ASHMAN JN, PATMORE HS, CONDON LT, CAWKWELL L, STAFFORD ND, GREENMAN J. Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer*. 89:864-9, 2003.
- BERGAMO NA, VEIGA LCS, REIS PP, NISHIMOTO IN, MAGRIN J, KOWALSKI LP, SQUIRE JA ROGATTO SR. Classical and Molecular Cytogenetic Analyses Reveal Chromosomal Gains and Losses Correlated With Survival in Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 11(2 Pt 1):621-31, 2005.
- BIENZ, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sciences* 31:35-40, 2006.
- BISGAARD ML, JÄGER AC, MYRHØJ T, BERNSTEIN I, NIELSEN FC. Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC): phenotype-genotype correlation between patients with and without identified mutation. *Hum Mutat*. 20(1):20-7, 2002.
- BRAAKHUIS BJ, BRAKENHOFF RH, LEEMANS CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Ann Oncol*. 16 Suppl 2:ii249-50, 2005.
- BUSTIN SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25, 169–193, 2000.
- CALIFANO J, WESTRA WH, MEININGER G, CORIO R, KOCH WM, SIDRANSKY D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res*. 6(2):47-52, 2000.
- CALIFANO, J.; van der RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B., KOCH, W.; SIDRANSKY, D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 56:2488-2492, 1996.
- CANEVARI R, ROGATTO, SR. Câncer de cabeça e pescoço, in *Oncologia Molecular*, p.189-202, 2004.
- CARVALHO AL, NISHIMOTO IN, CALIFANO JA, KOWALSKI LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 114:806-16, 2005.

- CARVALHO AL, SINGH B, SPIRO RH, KOWALSKI LP, SHAH JP. Differences in oral câncer in developing and develop nations: a multinstitutional study. Abstract Book of International Conference on Head and Neck Cancer, San Francisco, CA, USA, p75, 2000.
- CAVENEY WK, WHITE RL. The genetic basis of cancer. *Sci Am.* 272(3):72-9, 1995.
- CHEN C, RICKS S, DOODY DR, FITZGIBBONS ED, PORTER PG, SCHWARTZ SM. N-acetyltransferase 2 polymorphisms, cigarette smoking and alcohol consumption, and oral squamous cell cancer risk. *Carcinogenesis.* 22:1993-99, 2001.
- CHEN K, KATZ RV, KRUTCHKOFF DJ. Intraoral squamous cell carcinoma: epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer.* 66:1288, 1990.
- CHIN D, BOYLE GM, THEILE DR, PARSONS PG, COMAN WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br. J. Plastic Surgeons.* 57: 595-602, 2004.
- COLLINS JE, WRIGHT CL, EDWARDS CA, DAVIS MP, GRINHAM JA, COLE CG, GOWARD ME, AGUADO B, MALLA M, MOKRAB Y, HUCKLE EJ, BEARE DM, DUNHAM I. A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome *Genome Biol.* 5(10): R84, 2004.
- COOPER MP, JOVANOVIĆ A, NAUTA JJP, BRAAKHUIS BJM, DE VRIES N, VAN DER WAAL I ET AL. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 121:157-60, 1995.
- DE HERDT MJ, BAATENBURG DE JONG RJ. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Biosci.* 13:2516-26, 2008.
- DEPUE RH. Rising mortality from cancer of the tongue in young white males. *N Engl J Med.* 315:647, 1986.
- DEVESA SS, BLOT WJ, STONE BJ, MILLER BA, TARONE RE, FRAUMENI JF. JR Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 87:175-182, 1995.
- ENSEMBL. Disponível em: www.ensembl.org
- ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 358(11):1148-59, 2008.
- EWING B; GREEN P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces. Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research.* 8:186-194, 1998.
- FAKHRY C, GILLISON ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *Clin. Oncol.* 24(17):2606-11, 2006.

- FOULKES WD, BRUNET J-S, KOWALSKI LP, NAROD SA, FRANCO EL. Family history is a risk factor for squamous carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 63:769-73, 1995.
- FOULKES WD, BRUNET J-S, SIEH W, BLACK MJ, SHENOUDA G, NAROD SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: a retrospective case-control study. *Br Med J*. 313:716-20, 1996.
- GILLISON ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin. Oncol*. 31(6):744-54, 2004.
- GOLDSTEIN AM, PASTAKIA B, DIGIOVANNA JJ, POLIAK S, SANTUCCI S, KASE R, BALE AE, BALE SJ. Clinical findings in two African-American families with the nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCC). *Am J Med Genet*. 50(3):272-81, 1994.
- GOLLIN SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck*. 23:238-53, 2001.
- HAHN WC, WEINBERG RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 347(20):1593-603, 2002.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70, 2000.
- HARA H, OZEKI S, SHIRATSUCHI Y, TASHIRO H, JINGU K. Familial occurrence of oral cancer: report of cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 46(12):1098-102, 1988.
- HEIN DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res*. 30;506-507:65-77, 2002.
- HUNTER KD, PARKINSON EK, HARRISON PR. Profiling early head and neck cancer. *Nature Rev Cancer*. 5: 127-135, 2005.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer (<http://www.inca.gov.br>)
- IWASE S, JANUMA A, MIYAMOTO K, SHONO N, HONDA A, YANAGISAWA J, BABA T. Characterization of BHC8o in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun*. 17;322(2):601-8, 2004.
- JEFFERIES, S.; FOULKES, W.D. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 37(2):115-26, 2001.
- JIN C, JIN Y-S, WENNERBERG J, AKERVALL J, DICTOR M, MERTENS F. Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet Cytogenet*. 132:85-96, 2002.
- KNUDSON AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 68:820-823, 1971.

- KNUUTILA S, AUTIO K, AALTO Y. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. *Am J Pathol.* 157:689, 2000.
- KOCH WM, LANGO M, SEWELL D, ZAHURAK M, SIDRANSKI, D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope.* 109:1544-1551, 1999.
- KRISHNA SS, MAJUMDAR I, GRISHIN NV. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* 15;31(2):532-50, 2003.
- LANGE JC, BORCHERS J, DANAHEY D, SMITH S, STOVER DG, AGRAWAL A, MALONE JP, SCHULLER DE, WEGHORST CM, HOLINGA AJ, LINGAM K, PATEL CR, ESHAM B. Mutational status of overexpressed p16 in head and neck cancer: evidence for germline mutation of p16/p14ARF. *Int J Oncol.* 21(2):401-8, 2002.
- LI B, GOGOL M, CARREY M, LEE D, SEIDEL C, WORKMAN JL. Combinde action of PHD and chromo domain directs the Rpd35 HDAC to transcribed chromatin. *Science,* 316: 1050-1054, 2007.
- LOEB KR, LOEB LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis.* 21(3):379-85, 2000.
- MAMMALIAN GENE COLLECTION (MGC) PROGRAM TEAM. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24; 99(26): 16899-16903, 2002.
- MARSH D, ZORI R. Genetic insights into familial cancers – update and recent discoveries. *Cancer Lett.* 181(2): 125-64, 2002.
- MELLOR J. It takes a PHD to read the histone code. *Cell.* 14;126(1):22-4, 2006.
- MERTENS F, JOHANSSON B, HÖGLUND M, MITELMAN F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* 57:2765-80, 1997.
- MITELMAN F, JOHANSSON B e MERTENS F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. In: Mitelman F, Johansson B, Mertens F. (Eds), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. 2004.
- MITELMAN F, JOHANSSON B e MERTENS F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. In: Mitelman F, Johansson B, Mertens F. (Eds), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. 2007.
- MITELMAN F, JOHANSSON B e MERTENS, F. Mitelman Database Of Chromosome Aberration in Cancer. In: Mitelman F, Johansson B, Mertens F. (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. 2008.
- MIYAKAWA A., WANG XL., NAKANISHI H., IMAI FL., SHIIBA M., MIYA T., IMAI Y., TANZAWA H. Allelic loss on chromosome 22 in oral cancer: possibility of the existence of a tumor suppressor gene on 22q13. *Int J Oncol.* 13(4):705-9, 1998.

- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/>.
- NAWROZ H, VAN DER RIET P, HRUBAN RH, ET AL. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 54(5):1152-5, 1994.
- OLSHAN AF, WEISSLER MC, WATSON MA, BELL DA. Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis.* 22(1):57-61, 2001.
- PARKIN DM, PISANI P, FERLAY J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer.* 54:594-606, 1993.
- PARMIGIANI RB, CAMARGO AA. O genoma humano e o cancer. In: Ferreira CG, Rocha JCC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Ed Atheneu; p.03, 2004.
- POLI-FREDERICO RC, BERGAMO NA, REIS PP, KOWALSKI LP, ZIELENSKA M, SQUIRE JA, ROGATTO SR. Chromosome 22q a frequent site of allele loss in head and neck carcinoma. *Head Neck.* 22(6):585-90, 2000.
- PONDER BAJ. Cancer genetics. *Nature.* 411:336-41, 2001.
- PONDER BAJ. Inherited predisposition to cancer. *Trends Genet.* 6:213-218, 1990.
- REIS PP, POLI-FREDERICO RC, DOS SANTOS RM, NISHIMOTO IN, KOWALSKI LP, ROGATTO SR. Distinct regions of loss of heterozygosity on 22q in different sites of head and neck squamous cell carcinomas. *Med Sci Monit.* 8(3):89-94, 2002a.
- REIS PP, ROGATTO SR, KOWALSKI LP, NISHIMOTO IN, MONTOVANI JC, CORPUS G, SQUIRE JA, KAMEL-REID S. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene.* 21(42):6480-7, 2002b.
- RODRIGUEZ T, ALTIERI A, CHATENAUD L, GALLUS S, BOSETTI C, NEGRI E, FRANCESCHI S, LEVI F, TALAMINI R, LA VECCHIA C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 40: 207-213, 2004.
- RODRIGUEZ-BIGAS MA, BOLAND CR, HAMILTON SR, ET AL. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 89:1758-62, 1997.
- ROSSIT ARB , CONFORTI-FROES NDT. Epidemiologia Molecular – Xenobióticos e suscetibilidade genética na etiologia do câncer. In: Louro ID, Llerena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-froes N. *Genética Molecular do Câncer*. São Paulo, MGS Produção editorial, 2002.
- RUSHTON L. How much does the environment contribute to cancer? *Occup Environ Med.* 60(2):150-6, 2003.

- SANDBERG AA, MORGAN SS, MORGAN R, BOROS L. Trisomy 5 as sole anomaly in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 36(1): 31-4, 1988.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7, 1977.
- SANTOS EMM, OLIVEIRA LP, ROSSI BM. Apresentação. In: Santos EMM, Oliveira LP, Rossi BM. *Câncer Hereditário. Atualizações II.* São Paulo: Ed Libbs Oncologia; 2007.
- SCHANTZ SP, HSU TC, AINSLIE N, MOSER RP. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA.* 262:3313, 1989.
- SCHANTZ SP. Carcinogenesis, markers, staging, and prognosis of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 5(3):483-90, 1993.
- SCHERER SW, LEE C, BIRNEY E, ALTSHULER DM, EICHLER EE, CARTER NP, HURLES ME, FEUK L. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet.* 39(7 Suppl):S7-15, 2007.
- SCULLY C, FIELD JK, TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma: chromosomal aberrations. *Oral Oncol.* 36:311-27, 2000.
- SHAM JS, POON YF, WEI WI, CHOY D. Nasopharyngeal carcinoma in young patients. *Cancer.* 65:2606, 1990.
- SON UH, KAPP DS. Oral cavity and oropharyngeal cancer in young population: review of literature and experience at Yale. *Cancer.* 5:441, 1985.
- STEWART BW, KLEIHUES P. *World Cancer Report.* Geneva: International Agency for Research on Cancer. 3:232-6, 2003.
- STRUSKI S, DOCO-FENZY M, CORNILLET-LEFEBVRE P. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet.* 135:63-90, 2002.
- STURGIS EM, WEI Q. Genetic susceptibility--molecular epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 14(3):310-7, 2002.
- TAKAI D, JONES PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(6):3740-5, 2002.
- TAKES, R.P., BAATENBURG DE JONG, R.J.; SCHUURING, E.D.; LITVINIV, S.V.; HERMANS, J.; VAN KRIEKEN, J.H.J.M. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res.* 18:4793-4800, 1998.
- TASHIRO H, ABE K, TANIOKA H. Familial occurrence of cancer of the mouth. *J Oral Maxillofac Surg.* 44(4):322-3, 1986.

- THE MAMMALIAN GENE COLLECTION (MGC). The Status, Quality, and Expansion of the NIH Full-Length cDNA. *Genome Res.* 14(10b): 2121–2127, 2004.
- THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, DE BORMAN B, COUMANS B, HENNEN G, GRISAR T, IGOUT A, HEINEN E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 8;75(2-3):291-5, 1999.
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F; HIGGINS DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 4876–4882 *Nucleic Acids Res.* Vol. 25, No. 24, 1997.
- TUZUN E, SHARP AJ, BAILEY JA, KAUL R, MORRISON VA, PERTZ LM, HAUGEN E, HAYDEN H, ALBERTSON D, PINKEL D, OLSON MV, EICHLER EE. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* 37(7):727-32, 2005.
- UICC-União Internacional Contra o Câncer: Classificação dos tumores Malignos 5a ed., Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-Brasil, 1998.
- UMAR A, BOLAND CR, TERDIMAN JP, SYNGAL S, DE LA CHAPELLE A, RUSCHOFF J, FISHEL R, LINDOR NM, BURGART LJ, HAMELIN R, HAMILTON SR, HIATT RA, JASS J, LINDBLOM A, LYNCH HT, PELTOMAKI P, RAMSEY SD, RODRIGUEZ-BIGAS MA, VASEN HF, HAWK ET, BARRETT JC, FREEDMAN NA, SRIVASTAVA S. J. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Natl. Cancer Inst.* 96, 261–268, 2004.
- VARZIM MGM. Estudo de genes polimórficos codificadores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos associados ao cancro da laringe. Mestrado em Oncologia, Universidade do Porto, Portugal. 90 págs., 2000.
- VASEN HFA, MECKLIN JP, MEERA KHAN P, LYNCH HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 34:424–425, 1991.
- VASEN HFA, WATSON P, MECKLIN JP, LYNCH HT, the ICG-HNPCC. New criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC (ICG-HNPCC). *Gastroenterology.* 116:1453–1456, 1999.
- VERMA, R.S.; TRIANTAFILLOU, N.G. Oncogenetic map of human genome. *Cancer Genet Cytogenet.* 100(1):88-90, 1998.
- VERSCHUUR HP, IRISH JC, O’SULLIVAN B, GOH C, GULLANE PJ, PINTILE MA. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 109:249-58, 1999.
- VIOLA JPB, TEIXEIRA LK, WERNECK MBF. Imunologia Tumoral. In: Ferreira CG, Rocha JCC. *Oncologia Molecular.* São Paulo: Ed Atheneu, p.105, 2004.

- WALSH JE, LATHERS DM, CHI AC, GILLESPIE MB, DAY TA, YOUNG MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 8(3):227-38, 2007.
- WEINBERG RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 254: 1138-46, 1991.
- WHO World Health Organization. International of diseases for oncology, 2nd ed., World Health Organization, Geneva, 1990.
- YU GP, ZHANG ZF, HSU TC, SPITZ MR, SCHANTZ SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett*. 146:93-101, 1999.
- YU KK, ZANATION AM, MOSS JR, YARBROUGH WG. Familial head and neck cancer: molecular analysis of a new clinical entity. *Laryngoscope*. 112(9):1587-93, 2002.
- ZHANG ZF, MORGENSTERN H, SPITZ MR, TASHKIN DP, YU GP, HSU TC, SCHANTZ SP. Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 9: 1043-1049, 2000.