

Paola Jocelan Scarin Provazzi

Identificação de Marcadores
Moleculares em Tumores de Laringe





1910001282



IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM TUMORES DE LARINGE

Paola Jocelan Scarin Provazzi

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM TUMORES DE LARINGE

Paola Jocelan Scarin Provazzi



Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética,
como parte das exigências para
obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Paula Rahal

**São José do Rio Preto – SP
Fevereiro de 2004**

616-006.6

P969

40101045

Provazzi, Paola Jocelan Scarin.

Identificação de marcadores moleculares em tumores de laringe /
Paola Jocelan Scarin Provazzi – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004
87 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Paula Rahal

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Câncer - Aspectos genéticos. 2. Marcadores biológicos de tumor.
3. Biologia molecular. 4. Câncer de cabeça e pescoço. I. Rahal, Paula
II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas . III. Título.

CDU – 616-006.6



PAOLA JOCELAN SCARIN PROVAZZI

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM TUMORES DE
LARINGE**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador:

3º Examinador:

São José do Rio Preto, ____/____/____.



DEDICATÓRIA

À minha mãe,
a quem tudo é dedicado.



Aos meus pais,
à Cá e ao Alê.



AGRADECIMENTOS

À amiga Paula Rahal.



Meus sinceros agradecimentos...

À você Paula, minha orientadora e minha amiga, por acreditar em mim e confiar no meu trabalho. Agradeço ainda a dedicação extrema, a disponibilidade, a paciência e tudo que você me ensinou direta e indiretamente. Obrigada pelos conselhos, os exemplos, as broncas, as risadas, a amizade...

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, pelas sugestões apresentadas durante a realização da parte prática deste trabalho. Agradeço ainda a contribuição para minha formação acadêmica e profissional e todo conhecimento transmitido durante a realização da minha iniciação científica, momento em que foi minha orientadora.

Aos médicos Dr. José Francisco Góis Filho e Dra. Erica E. Fukuyama do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo e Dr. José Victor Maniglia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo por terem gentilmente cedido os tumores de cabeça e pescoço estudados neste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury por ter gentilmente realizado as microdissecções das amostras estudadas no presente trabalho.

Ao grupo de trabalho do Prof. Dr. Luís Fernando Reis do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Hemoglobina e Genoma - Hemocentro/Unicamp em especial ao Prof. Dr. Fernando Lopes e à Dulcinéia, Camila e Tarcísio.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e da seção de Pós-Graduação, por seu atendimento cordial.

Aos professores do curso de Pós-Graduação do IBILCE-UNESP, por ter contribuído para minha formação acadêmica.

Às Fundações CAPES, FAPESP e CNPq pelos auxílios concedidos ao laboratório, que contribuíram para a



realização do trabalho desenvolvido. Um agradecimento especial a CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos meus primeiros professores na prática da Biologia Molecular, Alessandra Trovó, Flávia e Marcos. Vocês também foram muito pacientes!

À todas as pessoas que trabalham comigo no Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Alessandra Trovó, Flávia, Uli, Alessandra Vidotto, Marília, Paty e Fernanda, pela amizade, apoio e convivência agradável.

À Melissa, amiga de longa data...companheira nos momentos felizes e nas horas difíceis. A você Mel agradeço a amizade sincera.

Aos meus irmãos pelo apoio e presença constante na minha vida.

À você mãe e à você pai agradeço todo apoio dado à realização deste trabalho e toda dedicação de vocês à minha formação profissional. Mais que isso agradeço por terem me dado o prazer de viver e ser feliz. Obrigada pelas lições diárias de amor, carinho, dedicação, companheirismo e tudo mais.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Oncogenes	20
Genes supressores de tumor	24
OBJETIVOS	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
RESUMO	85
ABSTRACT	87

INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço acomete aproximadamente 500.000 indivíduos anualmente no mundo (Parkin *et al.*, 1998), dos quais entre 50 a 60% morrem em um período de cinco anos após o diagnóstico (Greenlee *et al.*, 2001). No Brasil, as estimativas referem-se apenas ao câncer de boca, no qual calcula-se que em 2003, 7.750 homens e 2.885 mulheres foram atingidos pela doença com taxas de óbitos iguais a 2.540 para homens e 705 para mulheres (Ministério da Saúde, 2004). Mais de 90% das neoplasias de cabeça e pescoço são carcinomas espinocelulares (Sessions *et al.*, 1997).

Os sítios anatômicos acometidos variam desde a cavidade oral, a orofaringe, a hipofaringe e até a laringe. Dados da literatura mostram que o tipo de tumor mais comum em cabeça e pescoço é o de laringe (Landis, *et al.*, 1999), representando cerca de 25% dos tumores malignos que ocorrem nesta área e 2% de todas as doenças malignas. Aproximadamente 2/3 desses tumores surgem na corda vocal verdadeira e 1/3 acomete a laringe supraglótica (ou seja, localizam-se acima das cordas vocais) (Ministério da Saúde, 2004).

A laringe situa-se na parte mediana do pescoço, comunicando-se superiormente com a faringe e inferiormente com a traquéia (Erhart *et al.*, 1992) (Figura 1) e apresenta um esqueleto cartilaginoso (Figuras 2A e 2B). A maior das cartilagens é a tireóide, constituída de duas lâminas que se unem anteriormente em V; a cartilagem cricóide é impar e tem forma de um anel, situando-se inferiormente à cartilagem tireóide; a cartilagem aritenóide, uma de cada lado, é

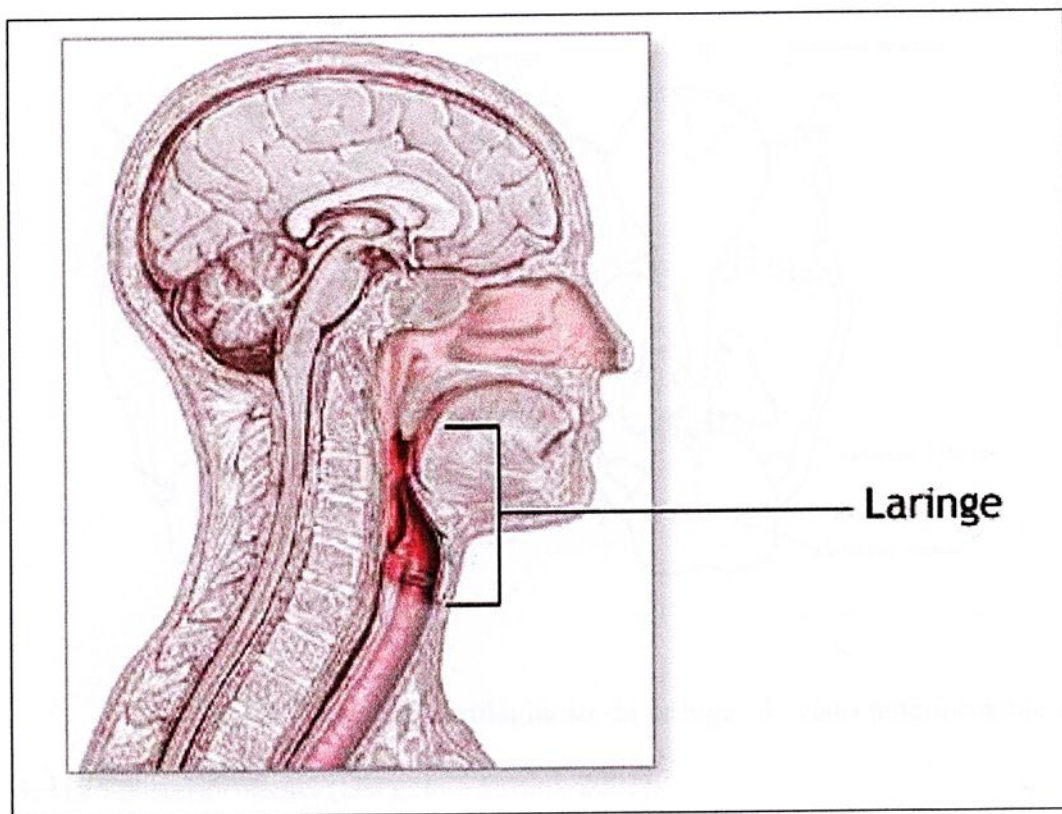


Figura 1: Corte sagital da cabeça e pescoço. (www.umm.edu)

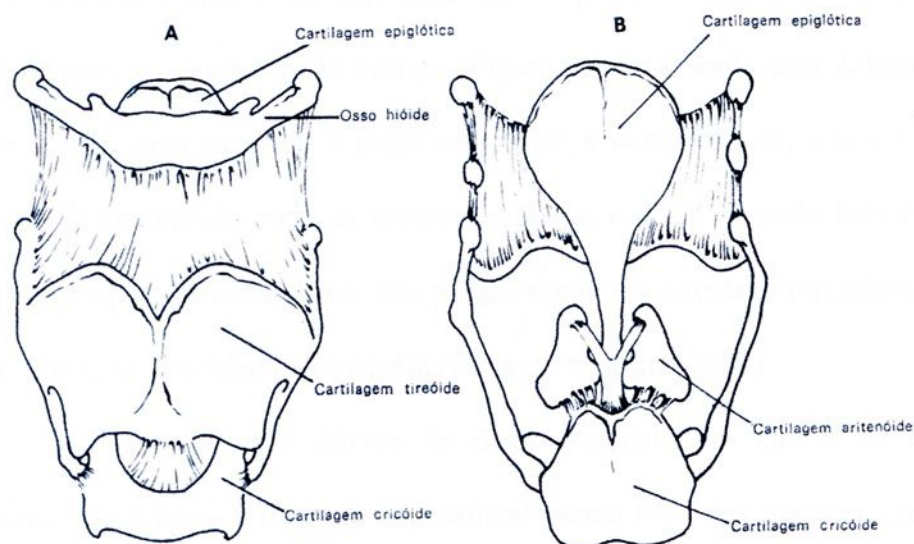


Figura 2: Esqueleto cartilagenoso da laringe. A, visto anteriormente e B, visto posteriormente. (Dangelo e Fattini, 2003).

semelhante a uma pequena pirâmide triangular de ápice superior e cuja base articula-se com a cartilagem cricóide (Figura 2B); a cartilagem epiglótica, ímpar e mediana, é fina e lembra uma folha peciolada, situando-se posteriormente à raiz da língua e cartilagem tireóide (Dangelo e Fattini, 2003). A superfície interna de uma laringe é composta de uma fenda ântero-posterior que leva a uma pequena invaginação, o ventrículo da laringe (Figura 3). Esta fenda está delimitada por duas pregas: uma superior, a prega vestibular, e outra inferior, a prega vocal. A porção compreendida entre as pregas vestibular e vocal de cada lado é a glote, enquanto aquela situada abaixo das pregas vocais é a cavidade infraglótica que se continua com a cavidade da traquéia (Dangelo e Fattini, 2003).

Os principais fatores de risco associados ao câncer de cabeça e pescoço são o fumo e o álcool. Aproximadamente 80% dos tumores nesse grupo estão relacionados com a exposição crônica a esses agentes (Vorauvud *et al.*, 1997). Em locais como laringe, faringe e cavidade oral, o efeito combinado do fumo e álcool pode multiplicar o risco de câncer (Maier *et al.*, 1992). Para o câncer de laringe as diferentes partes anatômicas precisam ser distinguidas quando se considera a etiologia. O tabaco domina o risco de câncer na corda vocal e glote, enquanto o álcool é mais proeminente para o câncer de supraglote (World Cancer Research Fund, 1997). Grande parte do risco é atribuída ao tabaco, mas a redução na ingestão do álcool pode ainda prevenir 1/4 dos casos (Tuyns *et al.*, 1988).



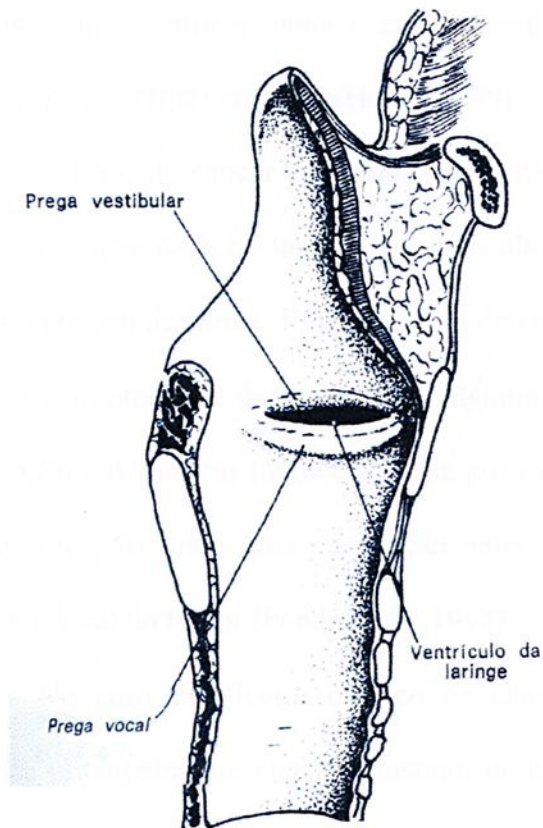


Figura 3: Cavidade da laringe em um corte sagital. (Dangelo e Fattini, 2003).

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de mais de 4000 substâncias, das quais pelo menos 40 são carcinogênicas. Entre essas, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as nitrosaminas são os principais componentes que formam adutos no material genético após sua ativação metabólica por diferentes enzimas (Hecht, 1999).

O risco de câncer está relacionado não apenas com o consumo mas também com a qualidade do tabaco e com os altos níveis de nicotina e pode ser diminuído pelo uso de filtros. Embora o tipo de tabaco consumido mais freqüente seja aquele com produção de fumaça, em algumas regiões geográficas também é comum o hábito de mascar fumo. Na Índia, por exemplo, o tabaco é enrolado em folhas de areca, havendo uma correlação entre o lado da boca utilizado para mascá-lo e o local do tumor (Pande *et al.*, 1998).

No caso do álcool, o risco de câncer de cabeça e pescoço está relacionado principalmente com o consumo de bebidas destiladas como vodka, whisky e conhaque (Szyfter *et al.*, 1999). Entretanto, o assunto é complexo e controverso em virtude das diferenças de medidas utilizadas pelos autores, porque nem sempre o consumo é restrito a um tipo de bebida e, também, existem variações no conteúdo alcoólico e nas impurezas e contaminantes entre marcas distintas de um mesmo produto (Wigth & Ogden, 1998).

O etanol é rapidamente absorvido pela mucosa gástrica e metabolizado principalmente no fígado, em etapas que envolvem oxidação a acetaldeído pela álcool desidrogenase (ADH), conversão desse último a acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH) e, finalmente, oxidação a CO₂, água e ácidos



graxos. Apesar do etanol puro não ser mutagênico ou carcinogênico, o acetaldeído, que é seu metabólico primário, é mutagênico (Obe *et al.*, 1986). Além disso, tem sido observado que a atividade de ADH é maior que a de ALDH na mucosa oral, o que levaria ao acúmulo de acetaldeído no local (Dong *et al.*, 1996). Tem sido sugerido que o álcool aumenta a penetração de carcinógenos pela mucosa (Simanowski *et al.*, 1995) e pode provocar alterações no epitélio, no fluxo de saliva e nos mecanismos de reparo do DNA (Wight & Ogden, 1998).

Outros fatores de risco incluem a infecção com papilomavírus humano (HPV) de alto grau, susceptibilidade genética e alguns componentes da dieta (Vorauvud *et al.*, 1997; Wight *et al.*, 1998). Fatores associados a uma dieta rica em frutas e vegetais apresentam um caráter protetor. Evidências de estudos epidemiológicos indicam que vitaminas como os carotenóides, retinol e vitamina C podem diminuir o risco de desenvolvimento do câncer de laringe (World Cancer Research, 1997).

Freqüentemente, pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, desenvolvem lesões múltiplas em diferentes sítios anatômicos, estando esse padrão multifocal de acordo com o modelo proposto por Slaughter *et al.* em 1953, denominado “cancerização de campo”. Esse modelo baseia-se na exposição repetida de um campo aos mesmos fatores de risco, como os carcinógenos presentes no álcool e no tabaco, levando ao desenvolvimento de lesões independentes. Dados moleculares e citogenéticos corroboram essa hipótese (Jin *et al.*, 1997; Waridel *et al.*, 1997; Lydiatt *et al.*, 1998; Scholes *et al.*, 1998).



Vários fatores clínicos têm se mostrado úteis no prognóstico em câncer de cabeça e pescoço, fatores estes que podem ser categorizados de acordo com o paciente, o tumor e os variados tipos de tratamentos (Quon *et al.*, 2001). Os fatores prognóstico relacionados ao paciente incluem: idade, consumo de tabaco e álcool, condição nutricional e estado imunológico. Os relacionados com a doença são: o sítio anatômico, o estadio da doença, invasão linfática, invasão perineural, aneuploidia, metástase em linfonodo, presença de rompimento da cápsula tumoral e padrão histológico da invasão. Nas neoplasias de laringe, o câncer glótico tem melhor prognóstico que o supraglótico e o subglótico (Berrino *et al.*, 1998). A presença de metástases nos linfonodos é o mais importante fator prognóstico para tumores de cabeça e pescoço (Dreyfuss *et al.*, 1991).

O tratamento nesse grupo de tumores é baseado na ressecção cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia. Porém, estas estratégias têm pouco impacto na sobrevivência dos pacientes acometidos pela doença (Greenlee *et al.*, 2001). Neste sentido, os esforços precisam ser continuados na tentativa de descobrir novas vias envolvidas na sobrevivência, diferenciação, invasão e metástase das células tumorais (Gonzalez *et al.*, 2003).

De acordo com um modelo estabelecido por Kinzler e Vogelstein (Kinzler & Vogelstein, 1993 e 1996), o desenvolvimento neoplásico é um processo de múltiplos passos que envolve o acúmulo de pelo menos sete eventos genéticos. Cada modificação no genoma presumivelmente conduz a alterações no programa transcricional normal da célula, resultando no descontrole de vários genes (Sok *et al.*, 2003). Muitos eventos biológicos no câncer de cabeça e pescoço



ainda não foram identificados (Gonzalez *et al.*, 2003). Contudo, investigações sistemáticas dentro do complexo molecular da carcinogênese vêm se desenvolvendo ultimamente, principalmente na busca por biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e de resposta dos pacientes à terapia.

Os eventos genéticos que freqüentemente acompanham a tumorigênese de cabeça e pescoço referem-se a alterações nos genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (Califano *et al.*, 1996). No câncer, os genes aberrantes raramente funcionam independentemente e há evidências mostrando a interação entre os seus produtos na regulação do crescimento normal da célula (Worsham *et al.*, 2003).

Atualmente, há um consenso na literatura sobre os genes que participam da carcinogênese de cabeça e pescoço e incluem alguns com papel de supressores de tumor e oncogenes.

ONCOGENES

CCND1

O gene *CCND1* também conhecido como *PRAD1*, localiza-se em 11q13 e seu produto (ciclina D1) pertence à família das ciclinas, proteínas regulatórias que interagem com as quinases dependentes de ciclinas (cdks) responsáveis pela regulação das transições do ciclo celular (Slingerland *et al.*, 1998). A ciclina D1 se liga a cdk4, e cdk6 e esse complexo promove a progressão do ciclo celular pela fosforilação da proteína retinoblastoma que é requerida para transição através do *checkpoint* G1/S. Anormalidades na ciclina D1 podem



resultar de inversões, translocações ou amplificação gênica (Quon, *et al.*, 2001). A literatura mostra a participação do gene *CCND1* na tumorigênese de cabeça e pescoço, no qual amplificação foi vista em 30 a 50% dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (Callender *et al.*, 1994) e em 26% a 39% (Masuda *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 1998). Nos carcinomas de laringe, Nadal e colaboradores em 2003, observaram amplificação gênica correlacionada com o aumento na expressão da proteína ciclina D1, sugerindo que esse é o mecanismo responsável pela expressão aumentada do gene. Ambos os fenômenos foram associados com evolução da doença, o que pode indicar um comportamento mais agressivo para casos que mostram amplificação/superexpressão. Em outros trabalhos realizados com 45 a 75 pacientes, foi observado uma correlação entre a amplificação de *PRAD1* e um prognóstico ruim em HNSCC (Meredith *et al.*, 1995; Bellacosa *et al.*, 1996; Akervall *et al.*, 1997; Kyomoto *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 1998).

EGFR

EGFR é uma glicoproteína transmembrânica de 170-KD cujo gene está localizado no braço curto do cromossomo 7 em 7p12 (Modjtahedi *et al.*, 1994). É um membro da família dos receptores de proteínas tirosina-kinase com vários ligantes a fatores de crescimento extracelulares, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF) e TGF- α . A ligação ao domínio extracelular de EGFR causa ativação de vários efetores que culminam na transcrição de outros genes responsáveis pela coordenação do crescimento celular (Quon *et al.*, 2001)



entre eles o oncogene *RAS* (Hackel *et al.*, 1999). Em linhagens celulares derivadas de tumores de cabeça e pescoço, a inibição de ambos, EGFR e TGF- α resultou na redução da proliferação celular (Grandis *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 1997). Estas observações conduzem a hipótese de que a ativação de EGFR por TGF- α promove o crescimento do tumor em HNSCC (Smith *et al.*, 2001). Em adição, a expressão de EGFR pode modular a sensibilidade do tumor à radioterapia. Huang e colaboradores, em 1999, mostraram em linhagens celulares derivadas de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço que o bloqueio de EGFR pelo anticorpo monoclonal C225 resultou na inibição do crescimento celular, acúmulo das células em G1, indução da apoptose, aumento da sensibilidade a radioterapia e aumento da apoptose induzida por radiação.

No carcinoma de laringe, o gene para o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) mostrou-se amplificado em 25% dos casos e seu RNAm apresentou aumento de expressão em 43% dos pacientes. Metade dos casos com expressão elevada ocorreram na ausência de amplificação gênica detectável. Este fenômeno ocorreu principalmente em tumores avançados (Irish *et al.*, 1993). Níveis protéicos de EGFR foram maiores nas amostras de tumor do que na mucosa normal, e os níveis maiores foram observados no tumores de alto grau (Scambia *et al.*, 1991). Altos níveis de EGFR estão associados com o alto risco de metástase em linfonodos (Almadori *et al.*, 1999).



RAS

Outro oncogene envolvido no carcinoma de cabeça e pescoço é o *RAS*. Este gene codifica uma proteína de membrana, que possui atividade GTPásica e está envolvida na transdução de sinal. A perda de heterozigosidade no locus *RAS* foi reportado em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Kiaris *et al.*, 1994). O papel do *RAS* na carcinogênese de laringe se mostra excepcional. Apesar da alta incidência de mutações encontradas nesse gene (Anwar *et al.*, 1993), trabalhos posteriores não confirmaram esses resultados (Shidara *et al.*, 1994; Fracchiolla *et al.*, 1995; Cazorla *et al.*, 1998). O aumento na expressão da proteína ras também foi demonstrada para o carcinoma de cabeça e pescoço, incluindo tumores de laringe. A expressão elevada de H-, K- e N-ras ocorreu na ausência de mutações gênicas (Yarbrough *et al.*, 1994) e foi independente do aumento na expressão de EGFR (Scambia *et al.*, 1994).

C-MYC

C-MYC é um fator de transcrição cujo gene localiza-se em 8q24 e que participa na regulação de outros genes envolvidos na proliferação celular normal e na apoptose (Marcu *et al.*, 1992). A expressão elevada de *C-MYC*, relacionada com rearranjo gênico, é um mecanismo oncogênico comum nos linfomas de células B (Wing *et al.*, 1991). Dolcetti e colaboradores, em 1991, relataram amplificação desse gene em 3 dos 23 carcinomas de laringe sem que tenha sido observado aumento na expressão do transcrito, sugerindo que este gene não tem um papel crucial para o desenvolvimento das neoplasias de laringe (cabeça e



pescoço). Outros trabalhos mostram resultados similares para amplificação desse gene, mas faltam dados sobre expressão gênica (de la Guardia *et al.*, 2001; Fracchiolla *et al.*, 1995; Haughey *et al.*, 1992).

GENES SUPRESSORES DE TUMOR

p16

Considera-se que a perda de 9p é um evento precoce na carcinogênese de cabeça e pescoço (Califano *et al.*, 1996; Worsham *et al.*, 1993). O gene supressor de tumor *CDKN2A* (também conhecido como *p16*) está localizado na região 9p21. Codifica uma proteína de 16KDa que se liga à kinase dependente de ciclina (cdk) 4 e 6, inibindo sua associação com a ciclina D (Serrano *et al.*, 1993). Altas frequências de perda de heterozigosidade em 9p21-22 são reportadas em displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma espinocelular nesse grupo de tumores (Nawroz *et al.*, 1994). Dados da literatura mostram que mutações somáticas nesse gene ocorrem em 10% dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e deleções homozigotas ocorrem em aproximadamente 50% dos casos (Reed *et al.*, 1996; Yuen *et al.*, 2002). A metilação de *CDKN2A* é outro mecanismo importante que causa inativação desse gene em tumores de cabeça e pescoço (Merlo *et al.*, 1995; Yuen *et al.*, 2002). Em estudos de perda de heterozigosidade envolvendo tumores de laringe, Rizos e colaboradores, em 1998, confirmaram o envolvimento de 9p na tumorigênese de cabeça e pescoço. Assim como Wing e colaboradores em 2002, que observaram inativação desse gene no carcinoma de laringe por mutação ou deleção homozigota em 22% de cada caso e, por hipermetilação, em

outros 7%. Consequentemente, os resultados mostram que pouco mais de 50% dos casos possuem o *p16* inativo.

TP53

Um outro gene conhecido por sua participação na progressão tumoral de cabeça e pescoço é o *TP53* (Jefferies *et al.*, 2001). O gene normal tem 20 kb de comprimento, compreendendo 11 exons localizados na região 17p13 do cromossomo humano (Gangopadhyay *et al.*, 1997; Levine *et al.*, 1997). Esse gene codifica uma proteína de 53 KDa cujas funções incluem a regulação da transcrição, síntese e reparo do DNA, coordenação do ciclo celular e apoptose (Sionov *et al.*, 1999) e, dessa maneira, participa na manutenção da integridade do genoma, interrompendo o ciclo celular ou conduzindo a célula à apoptose, quando o DNA está danificado (Silverman *et al.*, 2000). Mutações no *TP53* foram reportadas em 60% dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, freqüentemente nos códons 238-248 (Hainaut *et al.*, 1998). Rizos e colaboradores, em 1998, em estudos de perda de heterozigosidade envolvendo tumores de laringe, confirmaram o envolvimento de 17q na tumorigênese de cabeça e pescoço.

O primeiro relato do *TP53* no carcinoma de laringe ocorreu em 1992, no qual análises imunohistoquímicas detectaram expressão aumentada do gene relacionada a presença de alterações genéticas. Em uma série de 58 casos, 35 mostraram expressão aumentada do gene. Um número pequeno de casos foi submetido a análises para mutações e/ou alterações no RNAm. Todos os casos



positivos para imunohistoquímica mostraram mutações ou transcritos aberrantes, enquanto apenas um dos casos negativos mostrou RNAm aberrante (Maestro *et al.*, 1992). A superexpressão desse gene pôde ser observada mesmo em lesões pré invasivas e não mostrou relação quanto ao estadio tumoral e diferenciação histológica (Dolcetti *et al.*, 1992; Nadal *et al.*, 1995). Esses achados sugerem que alterações no *TP53* ocorrem em etapas iniciais na transformação neoplásica mas não fornecem vantagens adicionais para progressão desses tumores (Xu *et al.*, 1994).

p21^{WAF1}

O gene *WAF1/CIP1* está localizado em 6p21.2 e codifica uma proteína com atividade inibitória das kinases dependentes de ciclinas (Harper *et al.*, 1993), ativada pela p53 normal, mas não pela mutante (El-Deiry *et al.*, 1993). Nadal e colaboradores, em 1997, analisaram a expressão de p21^{WAF1} em amostras de carcinoma de laringe e observaram aumento de expressão em uma fração significativa dos casos, tanto para os transcritos quanto para as proteínas. Este foi um achado surpreendente que questionou o papel desse gene como supressor no câncer de laringe. Os níveis de expressão foram independentes da condição do gene *TP53*, mas estavam intimamente relacionados à diferenciação celular. Carcinomas pouco diferenciados foram imunohistoquimicamente negativos e apresentaram os níveis dos transcritos menores que na mucosa normal correspondente. Portanto, a expressão de p21^{WAF1} no carcinoma de laringe não é o resultado da ativação da p53, assim como não é um marcador da inativação do

TP53 e sim trata-se de uma proteína que participa na diferenciação das células escamosas da mesma maneira que no epitélio normal (Nadal *et al.*, 1997).

RB

O gene de susceptibilidade ao retinoblastoma foi o primeiro supressor de tumor identificado com base na diferenciação entre o retinoblastoma esporádico e o familiar (Knudson *et al.*, 1971). Perdas alélicas de 13q foram descritas no câncer de cabeça e pescoço (Scholnick *et al.*, 1994) embora não tenham sido relacionadas com perdas na expressão da proteína retinoblastoma analisadas por imunohistoquímica (Yoo *et al.*, 1994) que é um evento infrequente (Jares *et al.*, 1997). Esta falta de correlação indica que outros genes supressores de tumor podem localizar-se próximos ao locus do retinoblastoma, sendo os verdadeiros alvos de perdas de heterozigosidade (Yoo *et al.*, 1994).

Os dados apresentados acima ilustram alguns aspectos das bases bioquímicas do câncer, cuja compreensão está longe de ser completamente atingida. As lesões genéticas acumuladas no clone neoplásico provavelmente são responsáveis pela heterogeneidade clínica das neoplasias. Além disso, a mudança do tecido normal a neoplásico é acompanhada por mudanças no nível de expressão de um número variável de genes, refletindo na mudança do RNA correspondente, na eventual presença de transcritos de RNAm anormais (Moustafa *et al.*, 2002) bem como proteínas alteradas.

Atualmente, as pesquisas sobre o câncer no campo da biologia molecular têm se voltado para o estudo da expressão gênica, que pode responder a

diferentes questões relacionadas à biologia dos tumores. Normalmente, todas as células contêm os mesmos genes, porém algumas células expressam alguns genes e outras outros. Isto é denominado diferença de expressão gênica. A diferença entre uma célula normal e tumorigênica é também reflexo da expressão gênica. Em um tumor maligno há genes que estão sendo expressos, outros não estão e outros estão mutados.

O seqüenciamento completo do genoma humano forneceu a informação estrutural básica de todos os genes humanos. Técnicas funcionais como *microarrays*, Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) e a nova área de conhecimento, a Proteômica, permitem análises do nível de expressão de milhares de genes e proteínas, de uma única vez. O desenvolvimento dessas técnicas de rastreamento estão revolucionando as pesquisas sobre o câncer, assim como as demais áreas, pois podem identificar novos biomarcadores para diagnóstico, prognóstico, classificação tumoral, terapêutica, entre outras, relacionados à diferença de expressão em tecidos normais e tumorais (Kallioniemi, *et al.*, 2001).

A análise por *microarray* vem sendo aplicada para vários tipos câncer, como cólon (Alon *et al.*, 1999), mama (Sgroi *et al.*, 1999; Perou *et al.*, 2000; Veer *et al.*, 2002), linfoma de células B (Alizadeh *et al.*, 2000), pulmão (Sugita *et al.*, 2002) e cabeça e pescoço (Villaret *et al.*, 2000; Belbin *et al.*, 2002; Moustafa *et al.*, 2002), e também sob diferentes abordagens como na determinação do perfil de expressão gênica e resistência à drogas no tratamento do câncer (DeRisi *et al.* 1996; Wittes *et al.* 1999; Wilson *et al.* 1999; Golub *et al.* 1999; Alizadeh *et al.* 2000).



Moustafa e colaboradores, em 2002, compararam o perfil de expressão, por *microarray*, entre amostras de tumor de cabeça e pescoço e a mucosa normal correspondente. Para um total de 12.530 genes analisados, 213 apresentaram alterações nos níveis de expressão entre os dois tipos celulares, sendo 91 mais expressos e 122 menos expresso nos tumores relação às amostras normais. Muitos dos genes alterados não foram associados anteriormente com câncer oral e, nesse estudo, mostraram associação com a transdução de sinal (fatores de crescimento), estrutura celular, ciclo celular, adesão celular transcrição, apoptose, metabolismo. Em geral, a maioria dos genes com expressão elevada codificava para fatores de crescimento, incluindo *TGF- β 1* (*Transforming growth factor-beta 1*), *Fibroblast growth factor-5*, *Insulin-like growth factor binding protein-6*, *Insulin-like growth factor binding protein-5* e estrutura celular como *Fibronectin*, *Fibulin-2*, *Laminin B2* e *Fibrillin* enquanto aqueles genes com expressão diminuída no tumor estavam envolvidos com adesão e motilidade celular como *E-cadherin*, *Integrin- α 3* e *keratin*, apoptose como *TNF- α* (*Tumor necrosis factor*) e metabolismo como *GST phi* (*Glutathione S-transferase*).

Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo que combinou as técnicas de *Differential display* e análise por *microarray*, no qual foram observadas diferenças no padrão de expressão gênica em genes relacionados a motilidade celular em tumores de cabeça e pescoço quando comparados a mucosa normal correspondente. O trabalho revelou expressão reduzida dos genes *calgranulin B* (*CAGB*) e *zinc finger* (*ZNF-185*) relacionados à proliferação e diferenciação celular, *CD24* à adesão celular, *transglutaminase-3* (*TGM3*) à

diferenciação celular, *EHF* que codifica para o fator de transcrição EHF, *lymphoepithelial Kazal-Type-related inhibitor (LEKTI)* que é um inibidor de protease, e expressão aumentada de *periostin* relacionado a adesão celular nos tumores em relação aos tecidos normais (Gonzalez *et al.*, 2003).

Genes relacionados ao remodelamento tecidual também foram observados diferencialmente expressos no carcinoma oral através da análise por *microarray*, entre eles genes codificadores de 6 enzimas proteolíticas (5 proteínas MMP – genes da família das metaloproteinases e *uPA* – *urokinase-type plasminogen activator*) e 2 moléculas da matriz extracelular (*fibronectin-1* e *tenascin C*). Entre a família MMP, o nível médio de expressão de *MMP-1* (*Collagenase intersticial*) no tecido tumoral foi 35 vezes maior que na mucosa normal. Mais especificamente, *MMP-1*, *MMP-3*, *uPA*, *integrin- α 3*, *paxilin*, *tenascinC* e transcritos IL-6 exibiram aumento nos níveis de expressão em tecidos cancerosos que apresentavam metástases em linfonodos. *Integrin- α 3 β 1* é um receptor para laminina-5 na membrana basal e também se expressa em altos níveis na maioria das células aderentes transformadas e na maioria dos tumores. Dessa maneira pode ter um papel similar no remodelamento da matriz durante a tumorigênese e a invasão celular (DiPersio, *et al.*, 2000) comportando-se como um importante biomarcador de prognóstico para o câncer de cabeça e pescoço (Nagata *et al.*, 2003). Esses resultados estão de acordo com os relatados por Alevizos e colaboradores (2001) que, analisando o perfil de expressão gênica no carcinoma oral, também evidenciaram a expressão gênica diferencial, entre tecidos tumorais e normais, de genes relacionados ao remodelamento tecidual,

destacando-se *MMP*, *uPA*, *Cathepsin L* (catabolismo intracelular), *Fibronectin 1* (adesão e migração celular), *Fibrillin 1* (microfibrilas extracelulares) e *Keratin* (estrutura).

Em um estudo similar, Sok e colaboradores, em 2003, comparando o perfil de expressão por *microarray* entre amostras de tumor de cabeça e pescoço e da mucosa normal correspondente, identificaram 227 genes diferencialmente expressos dos quais 25.1% codificam proteínas extracelulares, 22.5% genes citosólicos, 17.6% genes associados a membrana, 13.7% genes nucleares e 1.3% genes mitocondriais. Foram evidenciados 2 genes com significante expressão reproduzível em todas as 9 amostras estudadas, enquanto esses genes não foram identificados no tecido normal correspondente. Um deles é o gene do colágeno humano tipo XI $\alpha 1$, que codifica um componente essencial da matriz extracelular intersticial. Outras formas de colágeno como *collagen, type I, alpha 2* também foram observadas diferencialmente expressas nesse grupo de tumores (Alevizos *et al.*, 2001). O outro gene é um clone de cDNA identificado na linhagem celular KG-1 de mieloblasto humano cuja sequência de 3.6 Kb revela homologia parcial com o cromossomo 17 humano. Em adição, também observaram mais de 30 oncogenes caracterizados previamente e 45 sequências associadas ao carcinoma de cabeça e pescoço. Neste estudo, a análise por agrupamento hierárquico, revelou que os perfis de expressão gênica obtidos a partir de um painel de 12000 genes foram suficientes para distinguir a maioria dos tumores dos tecidos não malignos.

A análise por agrupamento hierárquico também foi utilizada com o objetivo de classificar molecularmente tumores de cabeça e pescoço, no qual



Belbin e colaboradores, em 2002, mediram o padrão de expressão gênica global usando tecidos com HNSCC. Assim, identificaram 375 genes que diferenciavam pacientes com esse tipo de câncer em dois grupos clinicamente distintos. Esses genes representam funções como: transporte de moléculas, processamento e tradução do RNA, metabolismo, sinalização celular e transcrição. Alguns incluem genes já associados ao câncer como o *CEA* (*carcinoembryonic antigen*) que codifica uma proteína de superfície celular altamente glicosilada (Thompson *et al.*, 1989) associada a resposta do tumor ao tratamento para o carcinoma de cabeça e pescoço (Silverman *et al.* 1976).

Outros genes conhecidos por sua participação na carcinogênese de cabeça e pescoço foram observados diferencialmente expressos por Squire e colaboradores, em 2002. Entre eles o gene *C-MYC*, *CIP-1*, *interleukin-8* que é um mediador da resposta inflamatória e *integrin α -6* cuja função relaciona-se à adesão celular.

No Brasil, o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, SP, juntamente com a FAPESP lançaram em 1999 o Projeto Genoma Humano do Câncer, que visou identificar genes expressos em tumores malignos com alta incidência no Estado de São Paulo, incluindo as neoplasias de cabeça e pescoço. Com esse objetivo, foram geradas 1.187.324 seqüências, das quais 209.133 são provenientes de material obtido de tumores de cabeça e pescoço e destas aproximadamente 34000 são de tumores de laringe (Figura 4) (Brentani *et al.* 2003).



Todas essas evidências confirmam o envolvimento de genes chaves em processos relacionados ao desenvolvimento de neoplasias e mostram que novas pesquisas devem ser realizadas na tentativa de identificar biomarcadores para o diagnóstico precoce e também para o prognóstico do paciente.

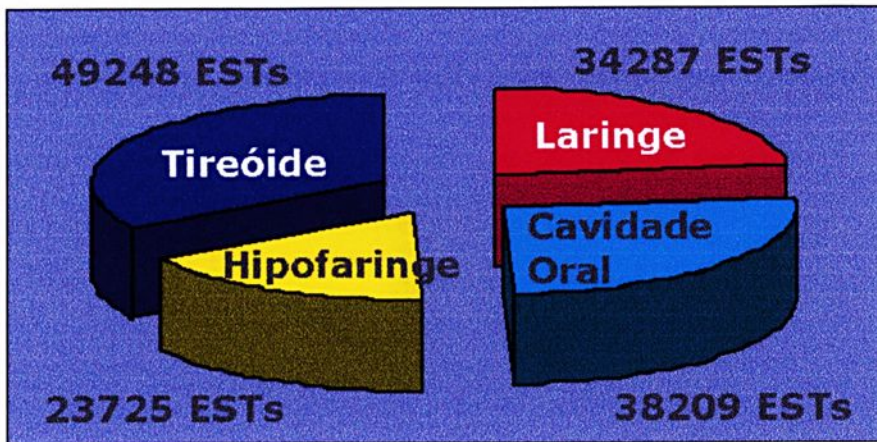


Figura 4: Número de ESTs geradas a partir de tecidos de cabeça e pescoço.

Biomarcadores potenciais na detecção precoce incluem indicadores da presença de alterações genéticas adquiridas e específicas. Este trabalho teve como objetivo gerar informação e caracterizar genes diferencialmente expressos que possam ser utilizados tanto no diagnóstico, prognóstico e na terapia do câncer do fígado, através de técnicas moleculares. Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1- Selecionar e validar genes candidatos relacionados ao câncer do fígado detectados em experimentos com microarrays;
- 2- Caracterizar estes candidatos e validar os resultados por biologia molecular;
- 3- Classificar os genes de acordo com o nível de expressão diferencial dos genes;
- 4- Validar estes resultados moleculares por PCR quantitativa (QPCR) em sangue e por ELISA em soro.

OBJETIVOS

Biomarcadores potenciais na tumorigênese incluem indicadores da presença de alterações genéticas generalizadas e específicas. Este trabalho teve como objetivo geral identificar e caracterizar genes diferencialmente expressos que possam ser utilizados futuramente no diagnóstico, prognóstico e na terapia do câncer de laringe, através de técnicas moleculares. Assim, os objetivos específicos do projeto foram:

- 1- Selecionar e caracterizar marcadores moleculares no câncer de laringe detectados em experimentos com *microarray*.
- 2- Caracterizar esses candidatos a marcadores moleculares por bioinformática e seqüenciamento.
- 3- Classificar as amostras de interesse de acordo com a expressão diferencial dos genes.
- 4- Validar esses marcadores moleculares por PCR quantitativa (PCR em tempo real) e/ou PCR semi-quantitativa.
- 5- Comparar os resultados obtidos entre as duas técnicas de amplificação.



Material

Introdução: Este trabalho tem como objetivo principal avaliar a eficácia da intervenção de saúde pública realizada no município de São Paulo, visando a redução da incidência de doenças transmissíveis. A metodologia utilizada foi a de estudo de caso, com coleta de dados por meio de entrevistas com profissionais de saúde e análise de registros médicos. Os resultados indicam que a intervenção foi eficaz na redução da incidência de doenças transmissíveis, sendo necessário continuar com as ações de saúde pública para manter os resultados alcançados.

Objetivos: O objetivo principal deste trabalho é avaliar a eficácia da intervenção de saúde pública realizada no município de São Paulo, visando a redução da incidência de doenças transmissíveis. Os objetivos secundários são: identificar os fatores que contribuíram para o sucesso da intervenção; avaliar a satisfação dos profissionais de saúde e da população com a intervenção; e identificar as dificuldades encontradas durante a implementação da intervenção.

Metodologia: A metodologia utilizada foi a de estudo de caso, com coleta de dados por meio de entrevistas com profissionais de saúde e análise de registros médicos. As entrevistas foram realizadas com profissionais de saúde que atuam no município de São Paulo, com o objetivo de identificar os fatores que contribuíram para o sucesso da intervenção. A análise dos registros médicos foi realizada com o objetivo de avaliar a incidência de doenças transmissíveis antes e depois da intervenção.

Resultados: Os resultados indicam que a intervenção foi eficaz na redução da incidência de doenças transmissíveis, sendo necessário continuar com as ações de saúde pública para manter os resultados alcançados. Os fatores que contribuíram para o sucesso da intervenção foram: a participação ativa da população; a atuação dos profissionais de saúde; e a atuação do poder público.

Conclusão: A intervenção de saúde pública realizada no município de São Paulo foi eficaz na redução da incidência de doenças transmissíveis, sendo necessário continuar com as ações de saúde pública para manter os resultados alcançados. Os fatores que contribuíram para o sucesso da intervenção foram: a participação ativa da população; a atuação dos profissionais de saúde; e a atuação do poder público.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no município de São Paulo, com o objetivo de avaliar a eficácia da intervenção de saúde pública realizada no município de São Paulo, visando a redução da incidência de doenças transmissíveis. A metodologia utilizada foi a de estudo de caso, com coleta de dados por meio de entrevistas com profissionais de saúde e análise de registros médicos.

Material

Inicialmente foram testadas aproximadamente 30 amostras para que fossem selecionadas 20 amostras de trabalho. Assim, o material de estudo compreendeu 10 tumores espinocelulares e 10 amostras de tecido histologicamente normal de laringe, provenientes de pacientes atendidos pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo e do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo. Os dados referentes as amostras foram obtidos de todos os casos a partir dos registros dos prontuários médicos. As informações compreenderam diagnóstico e local da lesão, idade, sexo, raça, exposição do paciente a agentes mutagênicos (fumo e álcool), estadiamento anátomo-clínico (tamanho da lesão, grau de infiltração, comprometimento de gânglios regionais ou distantes e comprometimento extra-ganglionar) e qual o tratamento destinado aos pacientes (Tabela 1) . Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa - CONEP do Ministério da Saúde (processo 25000.024.346/99-92, registro CONEP 669).



Tabela 1: Dados clínicos e patológicos dos indivíduos pertencentes ao grupo de estudo.

REGISTRO	IDADE	SEXO	RAÇA	FUMO	ÁLCOOL	TNM _c	TNM _p	SÍTIO PRIMÁRIO	TRATAMENTO	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA	STATUS ATUAL
NORMAIS											
190	55	M	C	P	P	T4N2M0	T4N2M0	Laringe	LT, RT	30 meses	ÓBITO
277061	51	M	C	P	P	T4N0M0	T4N2CM0	Glote	LT, RT	21 meses	---
196	58	M	C	P	P	T4N2M0	T4N2M0	Laringe	LT, RT	36 meses	ÓBITO
276516	61	M	C	P	P	T4N0M0	T4N0M0	Supraglote	LT	18 meses	---
276520	51	M	C	P	P	T4N2M0	T4N2M0	Glote	LT,RT	30 meses	ÓBITO
251357	76	M	C	P	P	T3N0M0	T4N0M0	Glote	LT,RT	67meses	ÓBITO 27/08/2002
279422	59	F	C	P	P	T4N0M0	T4N0M0	Laringe	LT,RT	18 meses	---
275632	50	F	C	P	P	T2N0M0	T2N0M0	Seio Periforme	LT, RT	20 meses	---
268498	47	M	C	P	P	T4N0M0	T4N0M0	Laringe	LT, RT	21 meses	---
271296	54	M	N	P	P	T3N1M0	T4N0M0	Glote	LT,RT	33 meses	---
TUMORES											
276520	51	M	C	P	P	T4N2M0	T4N2M0	Glote	LT,RT	30 meses	ÓBITO
9903908-7	51	M	C	P	P	T4N2M0	T4N2M0	CEC laringe	RT	7meses	ÓBITO
276576	52	M	M	P	P	T4N3M0	T4N3M0	Glote	LT, RT	9meses	---
9804910-0	53	M	C	P	P	T4N0M0	T4N0M0	CEC laringe	RT	24 meses	---
00-2055	56	M	C	P	P	T3N0M0	T3N0M0	Transglótico	Quimioterapia,RT	12 meses	---
277061	51	M	C	P	P	T4N0M0	T4N2CM0	Glote	LT, RT	21 meses	---
273125	58	M	C	P	P	T4N0M0	T4N1M0	Transglótico	LT, RT	14meses	---
276004	52	M	C	P	P	T2N0M0	T2N0M0	Glote	LT	22 meses	---
9901108-5	57	M	C	P	N	T4N2M0	T4N2M0	CEC laringe (corda vocal)	RT	18 meses	ÓBITO
251357	76	M	C	P	P	T3N0M0	T4N0M0	Glote	LT,RT	67meses	ÓBITO 27/08/2002

TNM_c = Estadiamento clínico, TNM_p = Estadiamento patológico, LT = laringectomia, RT = radioterapia, --- Desconhecido.



Métodos

I – Microdissecção

Inicialmente, todas as amostras foram microdissecadas pela patologista Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto que, utilizando micrótomo de congelamento, analisou cortes das amostras, permitindo a classificação e a separação precisa do tecido maligno, pré-maligno e normal por microdissecção, já que a mistura de células pode influenciar os resultados.

II – Preparação de RNA total

O sucesso da técnica depende principalmente da obtenção de RNA em quantidade e de alta qualidade. Como as moléculas de RNA são instáveis, para conservá-las, as amostras devem ser imediatamente colocadas à temperatura de -80°C, após sua retirada.

Para extração do RNA, nos tubos contendo os fragmentos congelados foram adicionados 2ml a 5ml de TRIzol, dependendo do tamanho da amostra, triturando através do *Politron* 3100, até a obtenção de lise celular. A próxima etapa foi a divisão das amostras em tubos limpos de 1,5ml, sendo 1ml para cada tubo, além de 250µl de clorofórmio em cada, misturando-se por 1 minuto e incubando-se por 2 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o RNA permaneceu exclusivamente na fase superior aquosa. Essa fase foi transferida para



um tubo de 1,5ml limpo, que recebeu um volume igual de isopropanol para precipitação do RNA. A solução foi homogeneizada e incubada à -20°C de um dia para outro. Em seguida, foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 μl de etanol 75% ao sedimento, seguindo-se de centrifugação por 10 minutos, com a mesma velocidade e temperatura descritas na etapa anterior. O sobrenadante foi descartado e o sedimento secou em temperatura ambiente. O RNA foi ressuspendido em 20 μl a 50 μl de água DEPC (dietil pirocarbonato). A próxima etapa foi a determinação da concentração dos RNAs ($1\text{DO}_{260} = 40\mu\text{g/ml}$), medindo-se a densidade óptica nos seguintes comprimentos de ondas: $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. A relação deve estar entre 1,7 e 1,9. 1 μg de RNA foi submetida a corrida eletroforética em gel de agarose 1% em TAE 1X para análise da qualidade do RNA.

Depois de isolado o RNA total, as moléculas foram utilizadas para síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

III – Obtenção do cDNA por transcriptase reversa

Para a reação de RT, foi necessário 1 μg do RNA total ao qual foi adicionado 1 μl de oligo (dT) ancorado (500 $\mu\text{g/ml}$) e 1 μl de dNTPs mix 10 mM. Em seguida, o material foi incubado a 65°C por 5 minutos. Ao término da incubação, foram acrescentados os seguintes reagentes: 2 μl de DTT 0.1mM, 1 μl de RNaseOUT (40U/ μl), 4 μl de tampão 5X Superscript e 1 μl da enzima transcriptase reversa Superscript II (200U/ μl).



O material foi incubado a 42°C por 50 minutos e a reação foi finalizada com a incubação a 70°C por 15 minutos.

IV – Amplificação do cDNA

A etapa seguinte foi a validação do cDNA, correspondente às 20 amostras, por meio da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de fragmentos dos genes *GAPDH* (*Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase*) e *TP53*, que serviram de controle para transcritos abundantes e raros, respectivamente.

As reações foram processadas em 25µl, contendo 100 a 500 ng de cDNA Tampão 1X, dNTP mix (200 µM), $MgCl^{2+}$ (1,0 mM para *TP53* e 1,5mM para *GAPDH*), oligonucleotídeos (0,2 pmol para *TP53* e 0,4 pmol para *GAPDH*) e Taq DNA polimerase (1unidade). Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA (controle de contaminação).

A reação compreendeu uma etapa inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos em temperaturas de 58°C (*TP53*) e 60°C (*GAPDH*) e 45 segundos a 72°C para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C para extensão final.

Após a reação, os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 2% (100Volts por 30 minuto), juntamente com um marcador de 100pb (Ladder Gibco 100pb), para verificar a amplificação de um fragmento de 340 pb referente ao transcrito do *TP53* e outro fragmento de 305



pb referente ao *GAPDH*. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra violeta.

As seqüências de bases dos oligonucleotídeos utilizados estão descritas a seguir:

GAPDH

TP53

5' CTGCACCACCAACTGCTTA

5'GGAGGAGCCGCAGTCAGA

5' CATGACGGCAGGTCAGGTC

5'CAAGAAGCCCAGACGGAAAC

Após validação do cDNA, a etapa seguinte foi a realização das PCRs Semi-Quantitativas para verificar os níveis relativos de expressão gênica dos marcadores nas amostras de tecidos normais e tumorais.

V – PCR Semi-Quantitativa.

Foi utilizada a técnica de PCR Semi-Quantitativa para verificar os níveis de expressão gênica dos marcadores relativos ao gene constitutivo *β -actina*, nas amostras normais e tumorais. Assim, os marcadores foram submetidos a reações com 14 ciclos, 21 ciclos, 28 ciclos e 35 ciclos, para a definir o número de ciclos necessário para obtenção do produto na fase exponencial da reação de amplificação. Nessa fase, ao contrário da fase de *plateau*, a concentração do amplificado é correspondente à concentração do DNA molde.

As condições de amplificação para todos os marcadores foram padronizadas em 25 μ l, contendo 100 a 500 ng de cDNA Tampão 1X, dNTP mix



(200 μ M), $MgCl^{2+}$ (1,5 mM), oligonucleotídeos (0,4 pmol) e Taq DNA polimerase (1 unidade). Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu cDNA (controle de contaminação).

A reação compreendeu uma etapa inicial de 4 minutos a 94°C, 28 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos em temperaturas de 60°C e 60 segundos a 72°C para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C para extensão final.

Após a reação, os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 2% (100Volts por 30 minuto), juntamente com um marcador de 100pb ou 50 pb, o que permitiu observar se houve amplificação e se o tamanho coincidia com o esperado. Os géis foram corados com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultra violeta e fotografados, seguindo posterior quantificação com a utilização do *software ImageQuant*, que mede o volume da banda pela média da intensidade dos *pixels* que compõem a área usada para quantificar a banda.

As seqüências de bases dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos marcadores testados nesta etapa, estão descritas na tabela 2, assim como o tamanho dos produtos de amplificação.

VI – PCR em tempo real – PCR Quantitativa

A técnica de PCR em tempo real foi desenvolvida recentemente para estudos envolvendo expressão gênica. Trata-se de um método de análise gênica que mede o acúmulo dos produtos de PCR à medida que vão sendo produzidos e,

Tabela 2. Candidatos a marcadores gênicos e seus respectivos oligonucleotídeos.

Marcadores gênicos	Tamanho	Seqüência 5' 3'	Tamanho do fragmento pb	Temperatura de anelamento °C
No match 1	20 20	CTAGTTCGGACCTCCCCTTC ATATGGAGTCTCCCCTTGCC	214	60
Hs. 344000	20 20	TTTAGGGGAAACGGGAAGAG CAGGCTGCTATCACAGGACA	339	60
No match 3	20 20	CTTCATTTCATATGCCCCAC CAAGAGATCAGGGTTCGTCC	215	60
MARK 3	20 19	GAACGCAAGAAAAGCTCCAC GTGTGGCTTCATGGGACAG	342	60
AC060775	20 20	TTAAGGGCAGCCAGAGAGAA AGGAGCTCTTTAGGGCAGG	276	60
No match 4	20 20	CTCAGCCAAGCACATACACC CGATGTCGGCTCTTCCTATC	203	60
TMFI	20 20	GAAGGCAAGCACGAAGAAAC CAGGACAAGCAGATGCAGAG	388	60
HLA-E	19 20	ACCTTCCAGAAGTGGGCAG TCCATATCACAGCAGCAACC	217	60
SET Translocation	24 21	TGAATGAGAGTGGTGATCCATCTT CTCGAACGTTTCGTCAAATCC	79	60
RPL15	21 20	AAGGCCAAGCAAGGTTACGTT TTAGGAACTGGGCGTTTTCG	71	60
DOT1	23 26	CACTACTCCCCACTCACCTCAGA GAGATTGTTGCAATTTTCTCTCAAT	89	60
ARTS1	22 26	CTCATCTTCCATAGCCCACATG GCTGAGAACCATTTTCTTTCAAAGAG	113	60
BCL2L11	20	GGAAGCATTGTTGGTGGTT GAAGTGGGATGAGGCATGTT	365	60
MITCYB	20 20	ATGGCCAACCTCCTACTCCT GCGGTGATGTAGAGGGTGAT	227	60
No match 2	20 20	TGAGGCACGAAGGTAAACA GTTGAACCATCCCTCAGACC	222	60
RPS 25	20 20	GTGGTCCAAAGGCAAAGTTC TCCACCCTTGGTATTCTGG	247	60

Amarelo = Marcadores testados nas reações semi-quantitativas, Azul = Marcadores testados nas reações quantitativas, Amarelo/Azul = Marcadores testados nos dois métodos de quantificação.

dessa maneira, quantifica as cópias dos genes estudados (Heid *e. al.*, 1996). As reações para quantificação foram realizadas em termociclador *iCycler iQ* (BioRad), localizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE – UNESP e também em termociclador *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (PE Biosystems), localizado no Laboratório de Hemoglobina e Genoma – Hemocentro/Unicamp – Campinas/SP.

As reações foram desenvolvidas em 25µl contendo 100 a 500 ng de cDNA, *SYBR GREEN Supermix* (KCl 100mM, Tris-HCl pH 8,4 40mM, dNTPs 0,4 mM, *iTaq DNA polymerase* 50 U/ml, MgCl₂ 6mM, *BYBR Green I*, *Fluorescein* 20nM e estabilizantes) (12,5µl) e oligonucleotídeos (300nM a 600nM).

A ciclagem compreendeu uma etapa inicial de 4 minutos a 94°C, 50 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos em temperaturas de 60°C e 60 segundos a 72°C para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C para extensão final.

Na seqüência, as amostras foram submetidas a quantificação e posterior análise segundo o método de quantificação relativa. Para entender esta análise, é necessário compreender o significado de C_T (*Threshold Cycle*) que é o momento no qual o sistema de amplificação começa detectar um aumento no sinal associado ao aumento exponencial do produto de PCR na fase linear da reação. Nesta avaliação, as comparações de quantidades são feitas a partir dos valores dos C_T s. Primeiramente calcula-se o ΔC_T que é a diferença entre os valores dos C_T



das amostras alvos e aqueles do controle endógeno (β -actina). Em seguida calcula-se o $\Delta\Delta C_T$ que é a diferença entre os valores de ΔC_T das amostras tumorais e ΔC_T das amostras normais.

Assim, os resultados foram analisados segundo as fórmulas:

$$\Delta C_T = C_T \text{ alvo} - C_T \beta\text{-actina}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ tumor} - \Delta C_T \text{ normal}$$

$$\text{Diferença comparativa de expressão} = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

Os marcadores testados nesta etapa estão apresentados na tabela 2 que mostra também as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplificados.

RESULTADOS

As amostras selecionadas para estudo foram inicialmente microdissecadas e, na sequência, submetidas a extração de RNA, quantificação em espectrofotômetro e validação do RNA através da realização da eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, que confirma a qualidade do RNA através da observação das duas bandas correspondentes às subunidades ribossômicas 28S e 18S. Como pode ser observado na Figura 5, as três primeiras amostras possuem RNA de boa qualidade pois apresentam as duas subunidades ribossômicas, diferentemente da última, no qual não é possível ver as bandas. Com isso, foi evidenciado que aproximadamente 30% das amostras avaliadas inicialmente, não apresentaram RNA de qualidade e portanto não foram empregadas no projeto. As 20 amostras que apresentaram RNA de qualidade foram utilizadas para a síntese do cDNA. Os cDNAs assim obtidos também exibiram boa qualidade na avaliação realizada por meio da amplificação por PCR dos transcritos dos genes *GAPDH* e *TP53*, que serviram de controle para transcritos abundantes e raros, respectivamente (Figura 6). A Tabela 4 mostra a concentração e a pureza do RNA extraído das 20 amostras. A concentração variou dependendo do tamanho da amostra e a pureza, em função das proteínas contaminantes presentes nas amostras, ficando o ideal em torno de 1.8.

Assim, o grupo de amostras selecionadas para o estudo foi composto por aquelas que apresentaram RNA e cDNA de qualidades, sendo 10 amostras normais e



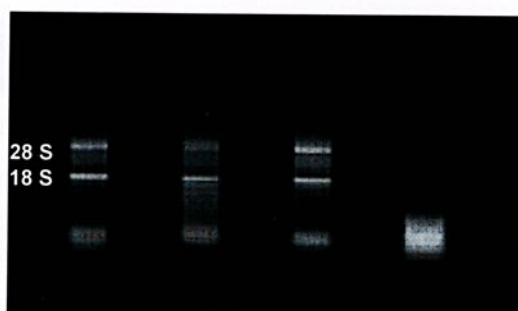


Figura 5: Avaliação dos RNAs em gel de agarose.

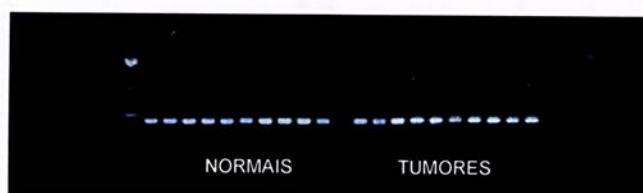


Figura 6: Gel de agarose 2% evidenciando os produtos de amplificação do gene *GAPDH* nas 10 amostras normais e 10 tumorais.

Tabela 4: Concentração e pureza do RNA extraído das amostras normais e tumorais

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	PUREZA
Normais		
1	4.2	1.9
2	0.988	1.8
3	0.232	1.8
4	3.6	1.9
5	0.904	1.8
6	2.0	1.8
7	0.8	1.6
8	1.5	1.5
9	1.9	1.6
10	1.7	1.5
Tumores		
11	5.4	1.8
12	5.7	1.7
13	8.0	1.9
14	3.06	1.7
15	5.6	1.7
16	3.8	1.8
17	5.9	1.9
18	6.3	1.9
19	7.9	1.7
20	5.5	1.8



10 amostras de tumores provenientes de 17 indivíduos. Com isso, 3 amostras são pareadas, ou seja, o tumor e a margem foram extraídos do mesmo paciente.

A população de estudo é representada por 15 indivíduos do sexo masculino e 2 do sexo feminino com idades variando de 51 a 76 anos, sendo a média igual a 55 anos. Todos os pacientes referiram exposição ao fumo e apenas 1 não referiu exposição ao álcool. A região predominante foi a glote. Do ponto de vista anátomo-patológico, foram mais freqüentemente observadas as lesões classificadas em T4N0M0. O tratamento de escolha foi predominantemente a associação da radioterapia com a laringectomia (extração da laringe) e o tempo de sobrevida variou entre 7 e 67 meses (média de sobrevida aproximadamente 24 meses) (Tabela 1).

Em experimentos de *microarray* que seguiram o Projeto Genoma Humano do Câncer, foram encontrados 200 clones diferencialmente expressos entre tecidos normais e tumorais de laringe. Desses, foram selecionados para serem validados 53 candidatos a marcadores moleculares por apresentarem diferença de expressão por 4 métodos estatísticos (*fold change*, *p-value*, *non-parametric p-value and variance*) entre amostras normais e tumorais. Esses clones diferencialmente expressos foram seqüenciados possibilitando identificar em bancos de dados o gene correspondente assim como sua função, localização cromossômica e ocorrência de rearranjos gênicos descritos. Aqueles com função conhecida, foram agrupados em categorias gênicas de acordo com critérios estabelecidos durante o Projeto Genoma Humano do Câncer – FAPESP/Ludwig.



Os sites consultados foram: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>, <http://www.Ige.ibi.unicamp.br/cancerhn> e <http://zeon.well.ox.ac.uk/cgi-bin/hgBlat?db=hg12> estando os resultados referentes a esta etapa apresentados na Tabela 5.

Os dados fornecidos na Tabela 5 mostram que dos 53 clones diferencialmente expressos, 23 são genes descritos na literatura, dos quais 20 possuem função gênica conhecida, 3 não possuem função gênica conhecida, 16 são seqüências presentes nos bancos de dados (*ESTs*) e 14 são seqüências sem similaridade nos bancos de dados (*No Match*). Dos genes com funções conhecidas, 8 estão relacionados ao metabolismo celular e incluem o *RPL15*, *GLO1*, *ARTS-1*, *MTCYB*, *RPS 25*, *P-150*, *DOT1L* e *MARK3*. Desses genes, 4 localizam-se em regiões de perdas cromossômicas em carcinoma de laringe sendo estes *RPL15*, *ARTS-1*, *RPS 25* e *MARK3*. A Tabela também evidencia outros genes localizados em regiões de perdas e ganhos em câncer de laringe como o *DDX34* (ganho), *TMF1*(perda) e *P38IP* (perda); todos relacionados à comunicação celular. O metabolismo de proteína é uma outra categoria funcional observada na Tabela e inclui os genes *RPL13A* e *PPAP2A*; este último localiza-se em 5q11, também uma região de perda cromossômica em tumores de laringe. Ainda, pela análise da Tabela 5, é possível encontrar outras categorias funcionais descritas, incluindo estrutura celular, representada pelos genes *C6orf53* e *KRT6B*; crescimento celular, desenvolvimento e manutenção representada pelos genes *SET translocation* e *BCL2L11*; estrutura celular, motilidade e transporte representada pelos genes *AP3M1* e *HLA-E* e metabolismo geral evidenciada pelo gene *HNRPK*.

Tabela 5: Categoria funcional e outras informações relevantes das 53 seqüências diferencialmente expressas nos experimentos com array.

SÍMBOLO DO GENE	NOME	Locus ID	Função gênica	Categoria gênica	Localização cromossômica	Perdas e ganhos em tumor de laringe
DDX34	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 34	9704	Metabolismo de RNA	Comunicação celular	19q13.3	Ganho
TMF1	TATA element modulatory factor 1	7110	Regulação da transcrição	Comunicação celular	3p21-p12	Perda
MGC4836	Similar to hypothetical protein (L1H 3 region) - human	201853	Desconhecida	Desconhecida	4p15.33	Perda
P38IP	Transcription factor (p38 interacting protein)	55578	Regulação da transcrição	Comunicação celular	13q13.2	Perda
SET translocation	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	6418	Ciclo celular	Crescimento celular, desenvolvimento e manutenção	9q34	
RPL13	Ribosomal protein L15	6138	Metabolismo de Proteína	Metabolismo celular	3p24.1	Perda
HSPC194 (C6orf53)	C6orf53: chromosome 6 open reading frame 53	51522	Membrana	Estrutura celular	6p24.1	
GLO1	Glyoxalase I	2739	Metabolismo geral	Metabolismo celular	6p21.3-p21.1	
ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	51752	Metabolismo de Proteína	Metabolismo celular	5q15	Perda
RPL13A	Ribosomal protein L13a	23521	Metabolismo de Proteína	Metabolismo de Proteína	19q13.3	
MGC2541 (SLC35A4)	Solute carrier family 35, member A4	113829	Desconhecida	Desconhecida	5q31.3	Perda
KRT6B	Keratin 6B	3854	Estrutura intracelular	Estrutura celular	12q12-q13	
AP3M1	Adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	26985	Transporte	Estrutura celular, motilidade e transporte	10q22.3	
HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3190	Metabolismo de RNA	Metabolismo geral	9q21.32-q21.33	
PPAP2A	Phosphatidic acid phosphatase type 2A	8611	Metabolismo de proteína	Metabolismo de proteína	5q11	Perda
KIAA0475 (FAM20B)	Family with sequence similarity 20, member B	9917	Desconhecida	Desconhecida	1p36.13-q41	
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	10018	Morte celular	Crescimento celular, desenvolvimento e manutenção	2q13	
MTCYB	Cytochrome b	4519	Respiração celular	Metabolismo celular	Mitocondrial	
RPS23	Ribosomal protein S25	6230	Metabolismo proteína	Metabolismo celular	11q23.3	Perda
P-150	Transposon		Transcriptase reversa	Metabolismo celular		
MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	4139	Metabolismo de Proteína	Metabolismo celular	1q42.11	Perda
AC060775	Clone RP11-678D18		Desconhecida	Desconhecida	Cromossomo 8	
DOT1L	Histone methyltransferase DOT1L	84444	Histone methyltransferase	Metabolismo celular	19p13.3	
No match 4	ESTs					

HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E	3133	Matri extracelular, membrana e citoesqueleto	Estrutura celular, motilidade e transporte
EST	Homo sapiens cDNA FLJ33631			
EST	Weakly similar to T50609 hypothetical protein DKFZp761B2423.1 - human (fragment) [H.sapiens]			
No match 5	ESTs			
EST	Homo sapiens cDNA FLJ37094 .			
EST	GE Weakly similar to hypothetical protein FLJ11267 [Homo sapiens] [H.sapiens]			
EST	Moderately similar to S29539 ribosomal protein L13a, cytosolic - human [H.sapiens]			
EST	Homo sapiens cDNA 3', mRNA sequence			
EST	Homo sapiens cDNA FLJ11458			
EST	hypothetical protein FLJ11152			
EST	Weakly similar to hypothetical protein FLJ13241 [Homo sapiens] [H.sapiens]			
No match 2	ESTs			
EST	Homo sapiens cDNA FLJ34480			
EST	Homo sapiens clone 23872 mRNA sequence			
EST	Homo sapiens cDNA clone DKFZp564A1871 3', mRNA sequence			
EST	Clone IMAGE:3355383, mRNA, partial cds			
EST	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3163886 5', mRNA sequence			
No match 3	EST			
No match 1	EST			
Hs. 344000	CDNA: FLJ22447 fis, clone HRC09479			
No match 6	ESTs			
No match 7	ESTs			
No match 8	ESTs			
No match 9	ESTs			
no match 10	ESTs			
No match 11	ESTs			
No match 12	ESTs			
No match 13	ESTs			
No match 14	ESTs			

Amarelo = Marcadores testados nas reações semi-quantitativas, **Azul** = Marcadores testados nas reações quantitativas,

Amarelo/Azul = Marcadores testados nos dois métodos de quantificação.



Outros mostram funções gênicas desconhecidas como *MGC4836* e *SLC35A4*, ambos localizados em regiões de perdas cromossômicas, e ainda o gene *FAM20B*.

A partir desses resultados foi possível fazer uma classificação hierárquica das amostras provenientes dos *arrays* (12 tumores e 7 normais) considerando a média de expressão dos 53 genes diferencialmente expressos. O resultado dessa análise mostra que as amostras normais e tumorais puderam ser diferenciadas em dois grupos distintos (Figura 7). O agrupamento representado em verde corresponde as amostras normais no qual há apenas uma amostra de tumor, e o vermelho corresponde às amostras tumorais.

A partir desses resultados, foram selecionados para serem validados no presente projeto 16 candidatos a marcadores moleculares, aqueles que apresentaram a maior diferença significativa de expressão nos experimentos de *array*. O seqüenciamento dos clones possibilitou a construção dos oligonucleotídeos para amplificação dos marcadores utilizando o programa Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3www.cgi>) e, para aqueles testados no termociclador *GeneAmp 5700 SDS* (PE Biosystems), o programa *Primer Express* (PE Biosystems).

Os marcadores foram validados nas 20 amostras de cDNA (10 normais e 10 tumores) sintetizados no presente projeto por meio das PCRs quantitativa e semi-quantitativa. Aqueles testados nas reações semi-quantitativas foram *BCL2L11*, *MTCYB*, *No Match 2*, *RPS25*, *No match 1*, *Hs. 344000*, *No match 3*, *MARK3*, *AC060775*, *No match 4*, *TMF1*, *HLA-E* e o gene constitutivo β -actina. Aqueles avaliados nas reações quantitativas foram *BCL2L11*, *MTCYB*, *No Match*



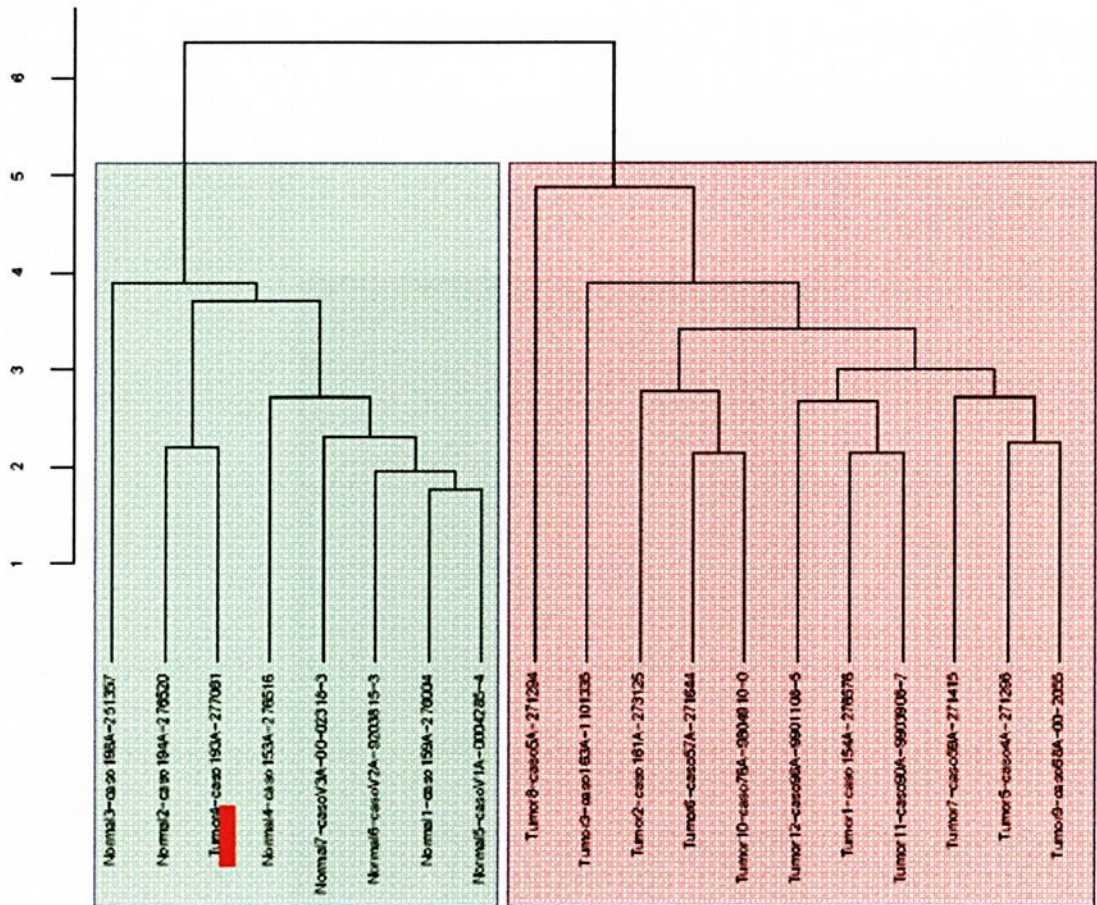
2, *RPS25*, *Set Translocation*, *RPL15*, *DOT1L*, *ARTS1* e também o gene constitutivo *β -actina* (Tabela 2). Esses genes estão destacados na tabela 5.

Na avaliação semi-quantitativa, inicialmente foram padronizadas as condições de PCR, no qual os marcadores foram submetidos a reações com 14 ciclos, 21 ciclos, 28 ciclos e 35 ciclos, para a definir o número de ciclos necessário para obtenção do produto na fase exponencial da reação de amplificação. Os resultados mostraram que as amostras de trabalho submetidas a 35 ciclos apresentavam uma amplificação saturada, enquanto que na condição de 21 ciclos, as bandas mostravam-se fracamente evidentes, o que levou a padronização da condição intermediária de 28 ciclos, tanto para os marcadores como para a *β -actina* (Figura 8). Todas as amostras foram submetidas a este procedimento e a partir da análise de imagem do gel, o *software* forneceu um valor numérico para cada banda. Esses valores foram trabalhados de modo a se obter uma razão entre a expressão do marcador e a expressão do gene constitutivo, tanto em tecidos normais quanto tumorais e o resultado é um valor relativo que se aproxima do valor real da expressão gênica avaliada.

Os valores assim obtidos para cada marcador foram comparados estatisticamente nos dois grupos amostrais pelo teste *T-Student* (consulta no site: <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>).

As reações quantitativas também iniciaram-se com as padronizações das reações referentes à concentração adequada dos oligonucleotídeos para os marcadores e para o gene constitutivo *β -actina*.





(Média)

Figura 7: Classificação hierárquica das amostras em um grupo normal e outro tumoral, provenientes dos experimentos de *array* de acordo com a média da expressão dos 53 genes diferencialmente expressos. O agrupamento representado em verde corresponde as amostras normais, e o vermelho corresponde às amostras tumorais.

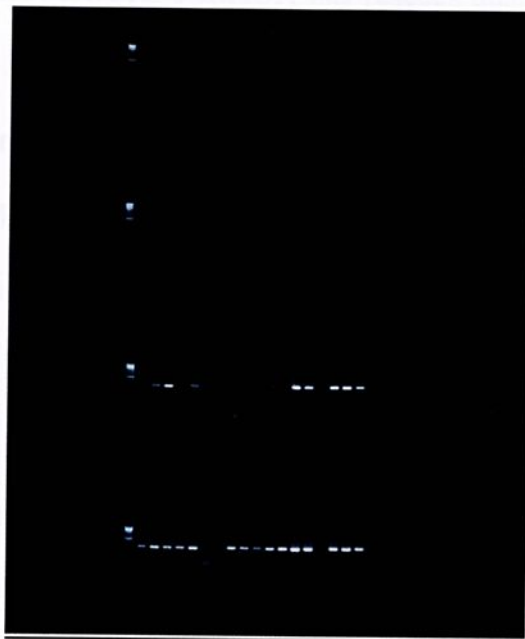


Figura 8: Gel de agarose 2% evidenciando os produtos de amplificação do gene β -actina em 14 ciclos, 21 ciclos, 28 e 35 ciclos nas 10 amostras normais e em 8 tumorais.

Os resultados mostram que os marcadores encontrados diferencialmente expressos foram a sequência *Hs. 344000* (Figuras 9 e 10), por meio da PCR semi-quantitativa e *BCL2L11*, *MTCYB*, *No Match 2*, *RPS25*, *Set translocation*, *RPL15*, *DOT1L* e *ARTS1*, nas reações quantitativas (Figuras 11 e 12).

A Figura 9 mostra a expressão aumentada da *Hs. 344000* nas amostras tumorais em relação às amostras normais (1,4 vezes). A Figura 10 representa o resultado da avaliação individual da expressão gênica desse transcrito nas 20 amostras estudadas no qual pode-se confirmar a expressão aumentada nos tumores.

A Figura 11 representa a análise da expressão diferencial dos genes *MTCYB*, *RPS25*, *BCL2L11* e *No Match 2* nas amostras normais e tumorais. O gene *MTCYB* foi encontrado 2 vezes mais expresso no tecido normal, enquanto o gene *RPS25* mostrou expressão 1.3 vezes maior na mucosa normal em relação as amostras de tumores. Outro gene que apresentou expressão aumentada no tecido normal (1.0 vez) é o *BCL2L11*. Observa-se ainda a expressão 750 vezes maior do transcrito *No Match 2* nos tumores em relação às amostras normais estudadas.

Outros genes mostrando aumento de expressão nas amostras tumorais são evidenciados na Figura 12 como o *Set Translocation* (1,4 vezes) e *ARTS1* (1.11 vezes). A Figura 12 evidencia também os genes *RPL15* e *DOT1L* com expressão aumentada nas amostras normais (3,3 vezes e 1.0 vez, respectivamente).

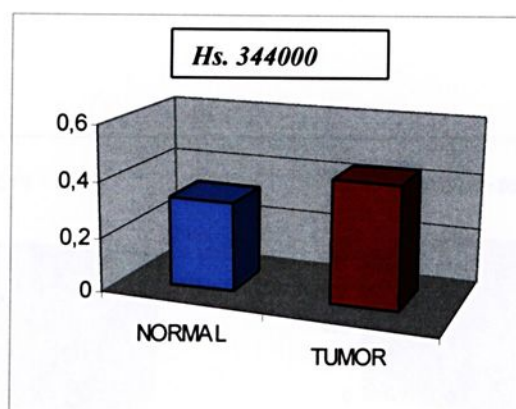


Figura 9: Análise semi-quantitativa. Média da diferença de expressão dos produtos de amplificação do marcador *Hs. 344000* nas amostras.

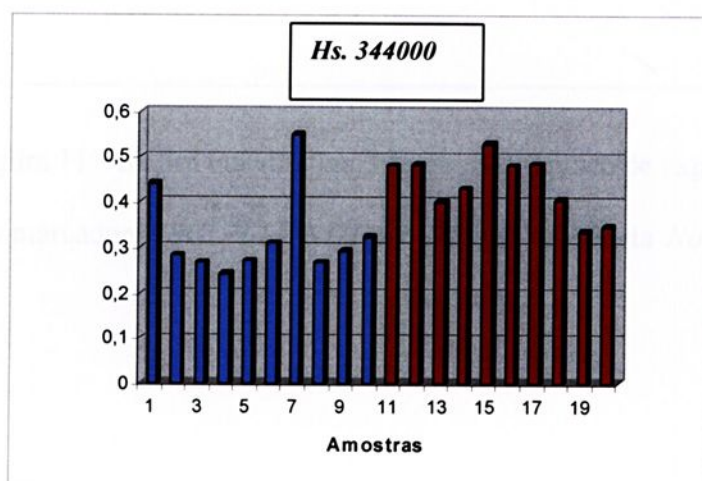


Figura 10: Análise semi-quantitativa. Diferença de expressão individual dos produtos de amplificação do marcador *Hs. 344000* nas amostras.

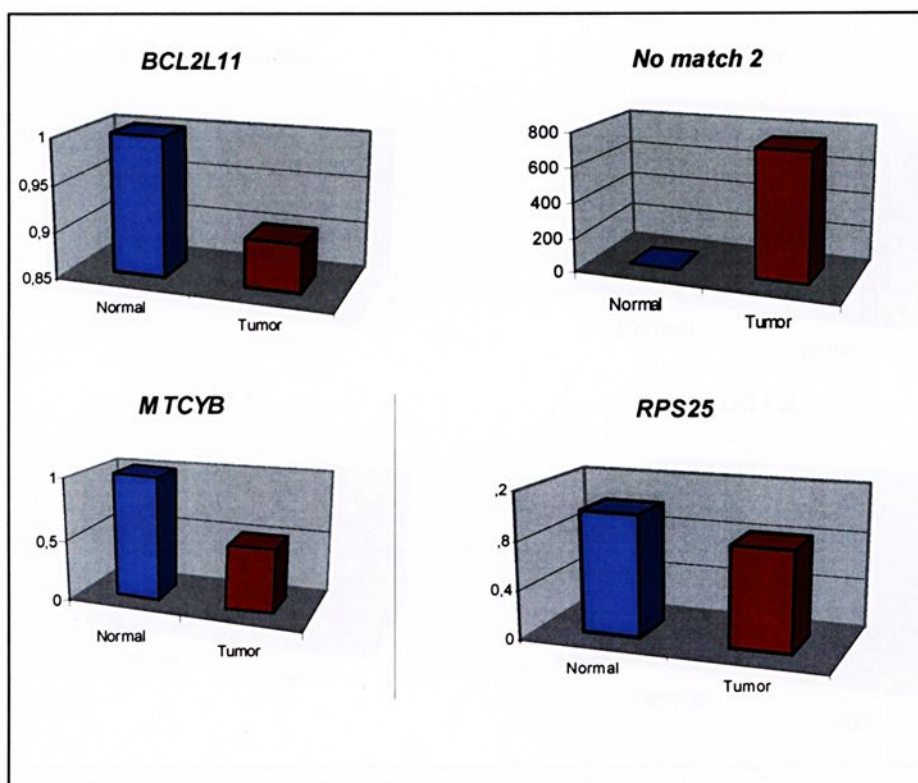


Figura 11: Análise quantitativa. Média da diferença de expressão gênica observada nos marcadores *BCL2L11*, *ND1*, *RPS25* e na sequência *No Match 2*.

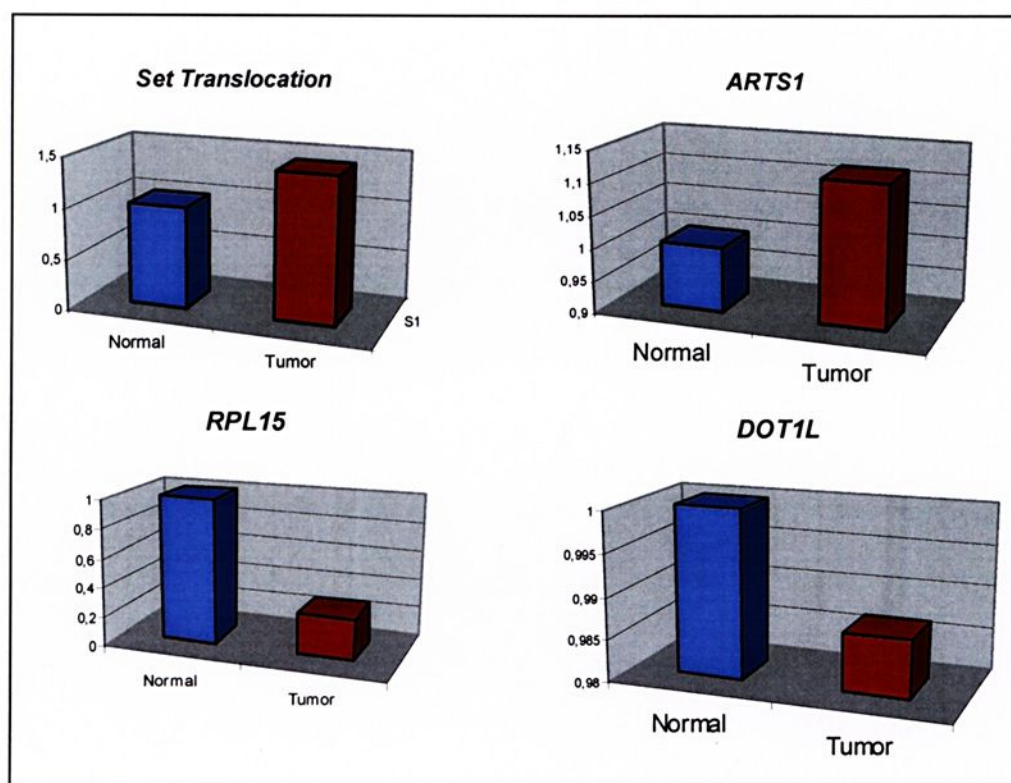


Figura 12: Análise quantitativa. Média da diferença de expressão gênica observada nos marcadores *Set translocation*, *RPL15*, *DOT1L* e *ARTS1*

de acordo com o que se sabe de sua história e da sua evolução. A história da ciência é uma disciplina que se desenvolveu ao longo do tempo, e a sua evolução é o resultado de um processo contínuo de descobertas e inovações. A história da ciência é uma disciplina que se desenvolveu ao longo do tempo, e a sua evolução é o resultado de um processo contínuo de descobertas e inovações.

A história da ciência é uma disciplina que se desenvolveu ao longo do tempo, e a sua evolução é o resultado de um processo contínuo de descobertas e inovações. A história da ciência é uma disciplina que se desenvolveu ao longo do tempo, e a sua evolução é o resultado de um processo contínuo de descobertas e inovações.

DISCUSSÃO

Com base no que foi discutido, podemos concluir que a história da ciência é uma disciplina que se desenvolveu ao longo do tempo, e a sua evolução é o resultado de um processo contínuo de descobertas e inovações. A história da ciência é uma disciplina que se desenvolveu ao longo do tempo, e a sua evolução é o resultado de um processo contínuo de descobertas e inovações.

O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo mais comum de neoplasias no mundo, sendo responsável por uma incidência mundial de aproximadamente 500.000 indivíduos anualmente (Parkin *et al.*, 1998). Os dados epidemiológicos têm apontado para o fumo e o álcool como os principais fatores de risco de transformação maligna nesse grupo, além de infecções virais e susceptibilidade genética (Gallo *et al.*, 1996). Nesse grupo de neoplasias, os tumores surgem em diversos sítios anatômicos do trato aerodigestivo e atingem com maior frequência a laringe (Landis *et al.*, 1999).

O tratamento de escolha é, em geral, a ressecção cirúrgica associada a quimioterapia e/ou radioterapia (Licitra *et al.* 2003). Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e de radiação, a taxa de sobrevivência para pacientes com HNSCC não aumentou significativamente, permanecendo em aproximadamente 50%. Associado a isso, a alta incidência de recorrência local e progressão da doença enfatizam a necessidade em identificar marcadores moleculares de diagnóstico, prognóstico e de resposta dos pacientes à terapia (Smith *et al.* 2003).

Com esse objetivo foram identificados 53 genes diferencialmente expressos em tumores de laringe pela técnica de *array*, os quais possibilitaram a classificação hierárquica das amostras estudadas em dois grupos distintos, um normal e outro tumoral. Foi observada uma única amostra tumoral classificada entre as normais. Podemos sugerir algumas explicações para este resultado como, por exemplo, a ocorrência de possíveis trocas entre o material normal e tumoral, a

presença de células normais na amostra ou ainda problemas nas várias etapas da metodologia.

A partir dos 53 marcadores diferencialmente expressos identificados nos *arrays*, foram validados em nosso estudo nove marcadores moleculares resultantes das análises semi-quantitativas e quantitativas. Os marcadores validados foram os genes *BCL2L11*, *MTCYB*, *RPS25*, *Set translocation*, *RPL15*, *DOTIL*, *ARTS1* e as seqüências *No match 2* e *Hs. 344000*.

Os genes *BCL2L11*, *MTCYB*, *RPS25* e a seqüência *No match 2* foram submetidos tanto a PCR quantitativa quanto semi-quantitativa, porém os mesmos só foram validados pela PCR em tempo real. Com esse resultado podemos notar a diferença de sensibilidade dos dois métodos de quantificação, no qual a PCR semi-quantitativa determina uma quantificação subjetiva baseada em um valor de inferência fornecido a partir da análise de imagem do gel. Isto não ocorre nas reações em tempo real onde os produtos de amplificação são medidos a medida que vão sendo produzidos (Heid *et al.*, 1996).

Foi observado que, dos nove genes validados, cinco estavam mais expressos no tecido normal em relação ao tumoral e quatro mais expressos no tecido tumoral em relação ao normal. Esses genes estão classificados principalmente dentro de duas categorias gênicas: metabolismo celular e crescimento celular, desenvolvimento e manutenção. Assim, entre os genes com expressão aumentada nas células normais, dois (*BCL2L11* e *DOTIL*) participam do crescimento celular, desenvolvimento e manutenção e três (*MTCYB*, *RPS25* e *RPL15*) participam do metabolismo celular. Entre aqueles mais expressos nos

tumores em relação as amostras normais um (*Set translocation*) relaciona-se ao crescimento celular, desenvolvimento e manutenção e outro (*ARTS1*) relaciona-se ao metabolismo celular. Outras duas seqüências encontradas com expressão aumentada no tumor, não estão classificadas quanto a função nos bancos de dados. Apesar disso a expressão aumentada nas células tumorais indica que tratam-se de transcritos importantes na carcinogênese de cabeça e pescoço.

O gene *BCL2L11* foi observado 1,0 vez mais expresso no tecido normal em relação ao tumor. Localiza-se em 2q13, uma região cromossômica onde ocorrem perdas no carcinoma de cabeça e pescoço. A proteína codificada por esse gene pertence a família de proteínas BCL-2. Os membros dessa família agem como reguladores anti ou pró apoptóticos que estão envolvidos em uma variedade de atividades celulares. No caso do gene *BCL2L11* o transcrito produzido age como um ativador apoptótico (O'Connor *et al.*, 1998). Essas informações aliadas aos nossos resultados sugerem a participação do gene *BCL2L11* na carcinogênese de cabeça e pescoço no qual a apoptose é um processo importante para o controle da proliferação celular. Não há registros na literatura de expressão diferencial desse gene em tumores de cabeça e pescoço ou outros tipos de câncer.

O gene *RPL15* localiza-se em 3p24.1, uma região de freqüentes perdas em câncer de cabeça e pescoço. Este gene codifica uma proteína componente da subunidade ribossômica 60S e pertencente a família L15E de proteínas ribossomais (Wang *et al.*, 2001). Foi evidenciada expressão aumentada desse transcrito em tumores esofágicos (Wang *et al.*, 2001) e tumores de próstata (Karan



et al., 2002) em relação a mucosa normal correspondente, indicando que esse gene pode estar relacionado com a progressão desses tipos tumorais. Em oposição aos dados da literatura, nossos resultados mostraram expressão aumentada (3,0 vezes) desse gene no tecido normal em relação ao tumoral.

No presente trabalho, foram obtidos resultados semelhantes na quantificação do gene *RPS25* que apresentou aumento de expressão 1,0 vez maior nos tecidos normais em relação aos tumorais. O gene *RPS25*, assim como *RPL15*, possui múltiplos pseudogenes. O produto gênico é uma proteína ribossomal componente da subunidade 40S e que pertence à família de proteínas ribossomais S25E cuja função é participar do metabolismo de proteínas (Kenmochi, N *et al.*, 1998). Não há informações sobre a ocorrência de expressão diferencial desse gene em câncer de laringe ou outros tipos tumorais. Localiza-se em 11q23.3 uma região de perdas cromossômicas em câncer de cabeça e pescoço. Os dados obtidos com a quantificação dos genes *RPL15* e *RPS25* sugerem que funções relacionadas à biossíntese dos ribossomos e síntese de proteínas podem apresentar-se como processos importantes para o desenvolvimento do câncer de laringe.

Outro gene encontrado 1,0 vez mais expresso nas células normais em relação às tumorais é o *DOT1L*. Esse gene codifica uma proteína com atividade metiltransferase de histonas, um importante mecanismo de regulação gênica (Feng Q *et al.*, 2002). Localiza-se em 19p13.3, uma região de perdas cromossômicas em câncer de cabeça e pescoço. A concordância entre a expressão diminuída desse gene e perdas em sua localização cromossômica nos tumores de cabeça e pescoço, sugerem que genes importantes para progressão tumoral podem estar sendo

transcritos em função da perda de atividade metiltransferase do gene do gene *DOTIL*.

Expressão aumentada também foi evidenciada 2,0 vezes maior nas amostras normais pelo gene *MTCYB* que codifica a única subunidade do complexo III que tem origem a partir de um DNA mitocondrial. O complexo III é a segunda enzima do processo de fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons (Schagger *et al.*, 1986; Gonzalez-Halphen *et al.*, 1988). Possivelmente esse resultado evidencia que processos essenciais para o funcionamento celular, como a respiração celular, podem estar alterados no câncer de laringe.

Genes que apresentaram aumento de expressão nas amostras tumorais em relação as normais foram *Set translocation* e *ARTS1*.

Set translocation foi observado 1,4 vezes mais expresso no tecido tumoral em relação ao normal. Localiza-se em 9q34, uma região onde não há registros de perdas ou ganhos cromossômicos nesse grupo de tumores. O produto desse gene interage com o inibidor do ciclo celular p21 (*Cip 1*). Superexpressão de SET bloqueia o ciclo celular na transição G2/M em linhagens celulares (COS e HCT116) através da inibição da atividade CDK1- ciclina B. Assim, a proteína SET pode regular a transição G2/M pela modulação da atividade CDK1-ciclina B. Foi observado ainda que formas mutantes de SET em que falta o domínio C terminal da proteína, não interagem com p21 e assim não exercem atividade de bloqueio do ciclo celular. (Rodrigues-Vilarrupla *et al.*, 2003). Carlson e colaboradores em 1998 encontraram expressão aumentada do transcrito do gene SET em células renais transformadas humanas. Ainda nesse estudo altos níveis

do RNAm e da proteína SET foram encontrados em tumores de Wilms. Considerando essas informações, nossos resultados sugerem que a expressão aumentada do gene *SET* nas amostras tumorais pode estar relacionada a falha no bloqueio da transição G2/M em decorrência de uma possível mutação nesse gene. Esse gene também foi associado a leucemia aguda não diferenciada (Von Lindern *et al.*, 1992).

O gene *ARTS1* é um regulador do receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 (TNF1) e localiza-se em 5q15 uma região de perdas em câncer de cabeça e pescoço assim como laringe. A literatura mostra a participação desse gene no desenvolvimento de gliomas. Sun e colaboradores, em 2003, observaram expressão diferencial do gene *ARTS1* em tumores da glia, através de análises por *microarray* e bioinformática, evidenciando a importância desse gene para o desenvolvimento desses. Em nossos experimentos, *ARTS1* foi encontrado 1,0 vez mais expresso nos tecidos tumorais em relação aos normais. Como não há registros na literatura sobre participação desse gene na tumorigênese de cabeça e pescoço, nossos resultados evidenciam a participação desse transcrito em tumores de laringe e enfatizam a necessidade de pesquisas adicionais para o melhor de sua contribuição para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

Futuras pesquisas são necessárias para melhor entendimento desses genes como marcadores de diagnóstico, prognóstico e de resposta dos pacientes à terapia no câncer de laringe.



1. Foram avaliadas as respostas fisiológicas dos animais em relação ao estresse causado por diferentes níveis de exposição ao ruído.
2. As principais alterações fisiológicas observadas foram: aumento da frequência cardíaca, aumento da pressão arterial, aumento da frequência respiratória, aumento da frequência de contração da musculatura esquelética, aumento da frequência de contração da musculatura cardíaca, aumento da frequência de contração da musculatura lisa, aumento da frequência de contração da musculatura estriada, aumento da frequência de contração da musculatura esquelética, aumento da frequência de contração da musculatura cardíaca, aumento da frequência de contração da musculatura lisa, aumento da frequência de contração da musculatura estriada.
3. Foi observado que os animais expostos ao ruído apresentaram alterações significativas em relação aos parâmetros fisiológicos avaliados, sendo que as alterações foram mais acentuadas em relação aos parâmetros fisiológicos avaliados.
4. Foram avaliadas as respostas fisiológicas dos animais em relação ao estresse causado por diferentes níveis de exposição ao ruído.
5. Os dados obtidos demonstram que o ruído pode causar alterações significativas nas respostas fisiológicas dos animais, sendo que as alterações foram mais acentuadas em relação aos parâmetros fisiológicos avaliados.

CONCLUSÕES

As conclusões obtidas no presente trabalho estão relacionadas a seguir:

- 1- Foram selecionados 53 marcadores moleculares importantes no câncer de laringe provenientes de experimentos com *microarray*.
- 2- As principais categorias funcionais representadas pelos 53 genes diferencialmente expressos no câncer de laringe são, metabolismo celular, comunicação celular, metabolismo de proteínas, estrutura celular, crescimento celular, desenvolvimento e manutenção, estrutura celular, motilidade e transporte e metabolismo geral.
- 3- Pôde-se fazer uma classificação hierárquica das amostras em dois grupos distintos, um normal e outro tumoral a partir das 53 seqüências diferencialmente expressas.
- 4- Foram validados 9 marcadores moleculares através da PCR quantitativa e semi-quantitativa. Os marcadores *BCL2L11*, *IVNS1ABP*, *No Match* e *RPS25* foram avaliados pelas duas técnicas mas só foram validados nas reações em tempo. Com isso podemos concluir que a PCR quantitativa é mais sensível que a PCR semi-quantitativa na avaliação da quantificação gênica.
- 5- Os genes validados fornecem informações importantes no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERMAN I. J. A. *et al.* Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinomas of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer*, v. 79, p. 186-189, 1997.
- AL-MOGHAYB A. *et al.* Identification of a gene associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary human epithelial and squamous carcinoma cells. *Nature*, v. 391, p. 393-396, 1998.
- ALPVIGTUN T. *et al.* Cyclin D1 gene expression profiling revealed by laser capture microdissection and microarray analysis. *Nature*, v. 391, p. 6196-6200, 1998.
- ALVAREZ A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, London, v. 400, p. 503-511, 1999.
- ALVAREZ A. A. *et al.* Epithelial growth factor receptor expression in primary human breast cancer: an independent prognostic factor of local node relapse. *Int. J. Cancer*, v. 80, p.1818-1821, 1999.
- ATTON V. *et al.* Rapid patterns of gene expression revealed by clustering analysis of human and mouse cDNA libraries probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, p. 6745-6750, Jan. 1999.
- CHEN K. K. *et al.* Ras gene mutation of HPV infection and prognosis in human laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 79, p. 1184-1190, 1997.
- DELLA F. L. *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Research*, v. 62, p. 4184-4190, 2002.
- DELLA F. L. *et al.* Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal carcinoma: its prognostic significance and clinical implications. *Ann. Oncol.*, v. 10, p. 173-178, 1999.
- DELLA F. L. *et al.* Variations in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the sites of origin of the tumors. *Eur. J. Cancer*, v. 34, p. 215-221, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERVALL, J.A. *et al.* Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. **Cancer**, v. 79, p. 380-389, 1997.

AL MOUSTAFA, A. *et al.* Identification o gene associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. **Nature**, v. 21, p. 2634-2640, 2002.

ALEVIZOS, I. *et al.* Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarrays anlysis. **Nature**, v. 20, p. 6196-6204, 2001.

ALIZADEH, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, Londres, n.403, p. 503-511, 2000.

ALMADORI, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression en primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. **Inst. J. Cancer**, v. 20, p.188-191, 1999.

ALON, U. *et al.* Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 12, n. 96, p. 6745-6750, jun 1999.

ANWAR, K. *et al.* Ras gene mutaiton of HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. **Int J Cancer**, v. 53, p. 22-228, 1993.

BELBIN, T.J. *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. **Cancer Research**, v. 62, p. 1184-1190, 2002.

BELLACOSA, A. *et al.* Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. **Clin Cancer Res.**; v. 1, n. 2,p. 175-80, jan. 1996.

BERRINO. F.; GATTA. G. Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the sitwe of origin of the tumors. **Eur J Cancer**, v. 34, p. 2154-61, 1998.

BRENTANI, H. *et al.* The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome, by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 13418-23, 2003.

CALLENDER, T. *et al.* PRAD 1/ cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN). **Cancer**, v.74, p. 142-158, 1994.

CALIFANO, J. *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res**, v.56, p. 2488-2492, 1996.

CARLSON, SG. *et al.* Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. **J. AM. Soc. Nephrol.** v.9, p.1873-1880, 1998.

CAZORLA, M.; HERNÁNDEZ, L. *et al.* Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. **J Pathol**, v. 186; p. 144-150, 1998

DANGELO e FATTINI. **Anatomia Humana Básica**. 2 ed, Atheneu, São Paulo 2003.

DE LA GUARDIA, C. *et al.* CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas. **Head Neck**, v. 23, p. 104-112, 2001.

DERISI, J. *et al.* Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. **Nat. Genet**, v. 14, p.457-460. 1996.

DiPERSIO, C. M. *et al.* Mouse keratinocytes immortalized with large T antigen acquire alpha3beta1 integrin-dependent secretion of MMP-9/gelatinase B. **J. Cell Sci**, v. 113, p. 2909-21. 2000.

DOLCETTI, R. *et al.* p53 overexpression is an early event in the development of human squamous-cell carcinomas of the larynx: genetic and prognostic implications. **Int J Cancer**; v. 52; p.178-182, 1992.

DOLCETTI, R. *et al.* M Proto-oncogene allelic variations in human squamous cell carcinomas of the larynx. **Eur Arch Otorhinolaryngo**; v. 1 248; p. 279-285, 1991.

DONG, YJ.; PENG, TK.; YIN, SJ. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth. **Alcohol**, v.13, p. 257-62, 1996.

DREYFUSS, AL. *et al.* Analysis of prognostic factors in squamous cell carcinoma of head and neck. **Hematol Oncol Clinic**, v.5, p.701-12, 1991.

EL-DEIRY, W.S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, v. 75, p. 817-825, 1993.

ERHART, Eros. **Elementos de anatomia humana**. 8. Ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 272 p.

ESTIMATIVAS da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Ministério da Saúde/Instituto nacional do câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 10 jan. 2004.

FENG, Q. *et al.*; Methylation of lysine 79 is mediated by a new family of HTMases without a set domain. *Curr Biol.*, v.25, p. 1052-8, 2002.

FRACCHIOLLA, N.S. *et al.* Multiple genetic lesions in laryngeal squamous cell carcinomas. *Cancer*, v. 75, p.1292-1301, 1995.

GALLO, O. *et al.* Increased mutagen-induced chromosome damage in patients with transformed laryngeal precancerosis. *Int. J. Cancer*, v. 68, p. 700-103, 1997.

GREENLEE, R.T. *et al.* Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, v. 51, p. 15-36, 2001.

GONZALEZ, H. E. *et al.* Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngology- Head & Neck surgery*, n. 129, p. 754-759, 2003.

GONZALEZ-HALPHEN, D.; LINDORFER, M. A.; CAPALDI, R. A. Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochemistry*. v. 27, p. 7021-7031, 1988.

GOTTSCHLICH, S. *et al.* Differentially expressed genes in head and neck cancer. *Laryngoscope*. ;v.108, n. 5, p. 639-644, may 1998.

GANGOPADHYAY, S. *et al.* The tumor supressor gene *p53*. In: Peters KVG, editor. **Frontiers in molecular biology**. Oxford University Press, 1997.

GOLUB, TR. *et al.* Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, v. 286, p. 531-537, 1999.

GRANDIS, J.R. *et al.* Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem*, v. 1, n.69, p. 55-62, apr. 1998.

GREENLEE, R. T. *et al.* Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin*, v. 51, p. 15-36, 2001.

HACKEL, P.O. *et al.* Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v.2, n.11, p. 184-189, apr 1999.

HAINAUT, P. *et al.* IARC database of *TP53* gene mutation in human tumours and cell lines: update compilation, revised formats and new visualization tools. **Nucleic Acid Res**, v.26, p. 205-213, 1998.

HARPER, J.W. *et al.* The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v. 7, p. 805-816, 1993.

HAUGHEY, B.H.; *et al.* c-myc oncogene copy number in squamous carcinoma of the head and neck. **Am J Otolaryngol**, v. 13, p.168-171,1992

HECHT, SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. **Mutat Res**, v. 424, p. 127-42, 1999.

HUANG, SM.; BOCK, JM.; HARARI, PM. Epidermal Growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Res**, v. 59, p. 1935-40, 1999.

IRISH, J.C.; BERNSTEIN; A. Oncogenes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, v.103, p.42-52, 1993.

JARES, P. *et al.* Disregulation of p16MTS1/CDK4I protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous-cell carcinoma of the larynx. **Int J Cancer**, v. 81, p. 705-711,1999.

JARES, P. *et al.* p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. **Oncogene**, v.15, p. 1445-1453,1997.

JEFFERIES, S. *et al.* Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, v. 37, p. 115-126, 2001.

JIN, C. *et al.* Clonal chromosome aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa. **Mutat Res**, v. 374, p. 63-72, 1997).

KALLIONIEMI, O. *et al.* Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 10, p. 657-662, 2001.

KARAN, D. *et al.* Expression profile of differentially-regulated genes during progression of androgen-independent growth in human prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v.23, p. 967-75.

KENMOCHI, N. *et al.* A map of human ribosomal protein genes. **Genome Res**, v. 8, p. 509-23, 1998.

KIARIS, H. *et al.* Loss of heterozygosity and microsatellite instability of the *HRAS* gene in cancer of head and neck. **Int J Oncol**, v. 5, p. 579-582, 1994.

KIHARA, C.; TSUNODA, T.; Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. **Cancer Res**, n. 61, v.17, p. 6474-6479, Sep. 2001.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, v. 87, p. 159-170, 1996.

KNUDSON, A.G. JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, p. 820-823, 1971.

KYOMOTO, R. *et al.* Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 6, n. 74, p. 576-581, dec. 1997.

LANDIS, SH. *et al.* Cancer statistics. **Cancer J Clin**, v. 49, p. 8-31, 1999.

LEETHANAKUL, C. *et al.* Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. **Oncogene**, v. 19; p. 3220-4, Jun 2000

LEETHANAKUL, C. *et al.* Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. **Oral Oncol**, n.36, v. 5, p.474-83 , sep 2000.

LEVINE, AJ. *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, p. 323-331, 1997.

LICITRA, L. *et al.* Cancer of the larynx. **Oncology Hematology**, v. 47, p.1-16, 2003.

LIOTTA L.; PETRICON, E. Molecular profiling of human cancer. **Nat Rev Genet**, n. 1, v. 1, p. 48-56, oct 2000.

LYDIATT, WM. *et al.* Molecular suport for field cancerization in the head and neck. **Cancer**, v.82, p.1376-1380, 1998.

MAESTRO, R. *et al.* High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. **Oncogene**, v. 7, p.1159-1166, 1992.

MAIER, H. *et al.* Tobacco, alcohol and the risk of head and neck cancer. **Clin Invest**, v. 70, p. 320-327, 1992.

MARCU, K.B.; BOSSONE, S.A.; PATEL, A.J. Myc function and regulation. **Annu Rev Biochem** v. 61, p.809-860, 1992.

MASUDA, M. *et al.* Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. **Cancer**, v. 78, p.390-395, 1996.

MEREDITH, S.D. *et al.* Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 121, n. 7, p.790-794, jul.1995.

MERLO, A. *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of tumor supressor *p16* in human cancers. **Nat Med**, v. 1, p. 686-692, 1995.

MONDJTAHEDI, H.; DEAN, C. The receptor for EGF and its ligands: expression, prognostic value and target for therapy in cancer. **Int J Oncol**, v. 4, p. 277-296, 1994.

MONJI, M. *et al.* Head and neck cancer antigens recognized by the tumoral immune system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p. 734-741, 2002.

MOTOKURA, T. *et al.* A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. **Nature**, n. 6318, v.350, p. 512-515, apr 1991.

MOUSTAFA, A. *et al.* Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. **Oncogene**, v. 21, p.2634-2640, 2002.

MUSADA, M. *et al.* Ciclyn D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. **Cancer**, v.78, p. 390-395, 1996.

NADAL, A. *et al.* p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. **J Pathol**, v. 175, p. 181-188, 1995.

NADAL, A.; CARDESA, A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. **Virchows Arch**, v. 1, n .442, p.1-7, 2003.

NADAL, A. *et al.* p21WAF1/Cip1 expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. **J Pathol**, v. 183, p. 156-163, 1997.

NAGATA, M. *et al.* Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. **Int J Cancer**; n. 106, v. 5, p. 683-689, sep 2003.

NAWROZ, H. *et al.* Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 54, p. 1152-1155, 1994.

NISHIMURA, G.; TSUKUDA, M. Cyclin D1 expression as a prognostic factor in advanced hypopharyngeal carcinoma. **J. Laryngol Otol**, v. 112, p. 552-555, 1998.

NOGUEIRA, C.P. *et al.* Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. **Laryngoscope**, v. 3, n. 108, p. 345-350, mar. 1998.

OBE, G.; JONAS, R.; SCHMIDT, T. Metabolism of ethanol in vitro produces a compound which induced sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes in vitro: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. **Mutation Res.**; v. 74, p. 47-51, 1986.

O-CHAROENRAT, P.; RHYS-EVANS, P.H.; ECCLES SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 7, n. 127, p. 813-820, Jul 2001.

O'CONNOR, L. *et al.* A novel member of BCL-2 family that promotes apoptosis. **EMBO**, v. 17, p. 384-95, 1998.

ONO, Y. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-1 mRNA related to eosinophilia and interleukin-5 gene expression in head and neck tumors tissue. **Virchows Arch**, v. 5, n. 431, p. 305-310, nov 1997.

PANDE, P. *et al.* pRB and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. **Oral Oncology**, v. 34, p. 396-403, 1998.

PARKIN, D. M.; LAARA, E.; MUIR, C. S. Estimates of the world-wide frequency of sixteen major cancers in 1980. **Int J Cancer**, v. 41, p. 184-97, 1988.

PATEL, S. *et al.* Identification of seven differentially displayed transcripts in human primary and matched metastatic head and neck squamous cell carcinoma cell lines: implications in metastasis and/or radiation response. **Oral Oncol.**, n. 33, v. 3, p. 197-203, may 1997.

PEROU C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**, n. 406, p. 747-752, 2000;

QUON, H.; LIU, F. F.; CUMMINGS, B. J. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. **Head & Neck**, v. 23, p. 147-159, 2001.

RAFFERTY, M.A. *et al.* An overview of the role and inter-relationship of epidermal growth factor receptor, cyclin D and retinoblastoma protein on the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the larynx. **Clin. Otolaryngol.**, v. 26, p.317-320, 2001.

REED, A. *et al.* High frequency of *p16* inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 56, p. 3630-3633, 1996.

RIZOS, E. *et al.* Loss of heterozygosity at 8p, 9p and 17q in laryngeal cytological specimens. **Oral Oncol**, v. 34, p.519-523, 1998.

ROSS, D.T. *et al.* Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nat Genet**, v. 24, p. 227-235, 2000.

RUBIN GRANDIS, J. *et al.* Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but normal mucosal epithelial cells. **Oncogene**, n.15, p. 409-416, 1997.

SARANATH, D. *et al.* High frequency mutations in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. **Br J Cancer**, v. 63,p. 573-578,1991.

SCAMBIA, G. *et al.* Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal tumors. **Cancer**, v.67, p.1347-1351,1991.

SCAMBIA, G. *et al.* Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic laryngeal tissues: correlation with histopathological features and epidermal growth factor receptors. **Br J Cancer**, v.69, p. 995-999, 1994.

SCHAGGER, H. *et al.* Isolation of the eleven protein subunits of the bcl complex from beef heart. **Methods Enzymol.** v. 126, p. 224-237, 1986.

SCHOLES, AG. *et al.* Synchronous oral carcinomas: independent or common clonal origin? **Cancer Res**, v.58, p.2003-2006, 1998.

SCHOLNICK, S.B. *et al.* Frequent loss of heterozygosity for Rb, TP53, and chromosome arm 3p, but not NME1 in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx. **Cancer**, v. 73, p.2472-2480,1994.

SERRANO, M. *et al.* A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, p. 704-707, 1993.

SGROI, D.C. *et al.* In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. **Cancer Res**, n. 59, v. 22, p. 5656-5661, Nov 1999.

SHIDARA, K. *et al.* Lack of synergistic association between human papillomavirus and ras gene point mutation in laryngeal carcinomas. **Laryngoscope**, v.104, p. 1008-1012, 1994.

SILVERMAN, N. A.; ALEXANDER, J. C.; CHRETIEN, P. B. CEA levels in head and neck cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 37, p. 2204-2211, 1976.

SIONOV, RV. *et al.* The cellular response to p53: the decision between life and death. **Oncogene**, v. 18, p. 6145-6157, 1999.

SLINGERLAND, J.A.T. Cell proliferation and cell death. In: Tannock IF, Hill RP, editors. **The basic science of oncology**. New York: McGraw-hill, 1998

SIMANOWSKI, UA. *et al.*; Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. **Alcohol**, v.12, p. 111-5, 1995.

SMITH, B.; HAFFTY, B. G.; SASAKI, C. T. Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma; their biological function and prognostic significance. **Otol Rhinol Laryngol**, v.110, n. 3, mar 2001.

SOK, J.C. *et al.* Tissue-specific gene expression of head and neck squamous cell carcinoma in vivo by complementary DNA microarray analysis. **Arch otolaryngol head neck surg**, v. 129, p.760-770, july 2003.

SPENCER, CA.; GROUDINE, M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. **Avd Cancer Res**, v. 68, p. 1-48, 1991.

SQUIRE, J.A. *et al.* Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. **Head Neck**, v.9 n.24, p.874-887, Sep. 2002.

SUGITA, M. *et al.* Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. **Cancer Res**, v.14, n.62, p. 3971- 3979, jul 2002.

SUN, JY. *et al.*; Bioinformatic analysis of glioma development relative genes. **Ai Zheng**, v.33, p. 225-9, 2003.

SZYFTER, K. *et al.* Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. **Mutat Res**, v. 445, p.259-79, 1999.

TAKES, R. P. *et al.* Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumors in head and neck cancer. **J Pathol**, n. 194, p. 298-302, 2001.

THOMPSON, J. A. *et al.* Analysis of the size of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family: isolation and sequencing of N-terminal domain exons. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 158, p. 996-1004, 1989.

TODD, R. *et al.* DNA hybridization arrays for gene expression analysis of human oral cancer. **J Dent Res.**; n.81, p. 89-97, 2002.

TUYNS, A.J. *et al.* Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). **Int. J. Cancer**, v. 41, p. 483-491, 1988.

VAN'T VEER, L.J. *et al.* Gene expression profiling clinical outcome of breast cancer. **Nature**, n. 415, p. 530-536, 2002.

VILARRUPLA,-RODRIGUEZ, CN. *et al.* The SET protein regulates G2/M transition modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. **J. Biol Chem**, v.278, p. 1158-64, 2003.

VILLARET, D.B. *et al.* Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. **Laryngoscope**, v. 3 Pt 1, n. 110, p. 374-381. Mar 2000.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends Genet**, v. 9, p. 138-141, 1993.

VON LIDERMAN, M. *et al.*; Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by of it's 3'had to different gene: characterization of set genes. **Mol Cell Biol**, v.12, p.3346-55, 1992.

VORAUVUD, N. *et al.* Squamous cell carcinoma of head and neck. **J Med Assoc**, v. 80, p.207-218, 1997.

WANG, Q. *et al.* Cloning and characterization of full length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. **Gene**, v.24, p. 205-209, 2001.

WARIDEL, F. *et al.* Fiel cancerization and polyclonal *p53* mutation in the aero digestive tract. **Oncogene**, v. 14, p. 441-417, 1998.

WERNER, J.A. *et al.* Expression of a novel mRNA in human head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol Pathol**, v. 50, n.2, p. 82-86, apr 1997.

WIGHT, AJ *et al.* Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. **Oral Oncology**, v. 34, p.441-7, 1998.

WORSHAM, MJ. *et al.* Chromosomal biomarkers in the clonal evolution of head and neck squamous neoplasia. **J. Cell Biochem Suppl**, v.17, p.213-22.

WORSHAM, MJ. *et al.* Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 129, p. 702-8, 2003.

YUEN, PW. *et al.* Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. **J Clin Pathol**, v. 55, p. 58-60, 2002.

Food, Nutrition and Prevention of Cancer: a Global Perspective, 1997. World Cancer Research Fund. Disponível em <http://www.wcrf-uk.org>. Acesso em 10 Jan 2004.

XU, L. *et al.* Overexpression of *p53* protein in squamous cell carcinomas of the head and neck without apparent gene mutations. **Diagn Mol Pathol**, v. 3, p. 83-92, 1994.

YARBROUGH, W.G. *et al.* Ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Laryngoscope**, v.104, p. 1337-1347, 1994.

YOO, G.H. *et al.* Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 54, p. 4603-4606, 1994.

O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo mais comum de neoplasia no mundo. Mais de 90% das neoplasias de cabeça e pescoço são carcinomas espinocelulares. Os dados epidemiológicos têm apontado para o fumo e o álcool como os principais fatores de risco de transformação maligna nesse grupo. Os tumores surgem em diversos sítios anatômicos e atingem com maior frequência a laringe. O tratamento de escolha é, em geral, a ressecção cirúrgica associada a quimioterapia e/ou radioterapia. Apesar dos avanços no tratamento, a sobrevida dos pacientes com HNSCC não aumentou significativamente, nos últimos 20 anos permanecendo em aproximadamente 50%. Associado a isso, a alta incidência de recorrência local e a progressão da doença, enfatizam a necessidade em identificar marcadores moleculares de diagnóstico, prognóstico e de resposta dos pacientes à terapia. Com esse objetivo foram identificados 53 genes diferencialmente expressos em tumores de laringe pela técnica de *array*, dos quais foram validados em nosso estudo 9 marcadores moleculares resultantes das análises semi-quantitativas e quantitativas. Esses marcadores são os genes *BCL2L11*, *MTCYB*, *RPS25*, *Set translocation*, *RPL15*, *DOT1L*, *ARTS1* e as seqüências *No Match 2* e *Hs.344000*, que, estão classificados principalmente dentro de 2 categorias gênicas: metabolismo celular e crescimento celular, desenvolvimento e manutenção.



ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma is the sixth most common malignancy worldwide, representing health problem. The 5-year survival rate for this disease is about 59%; as a result, > 30,1000 cases and 7,800 deaths occur annually in the United States. These tumors arise from diverse anatomical locations, including the oral cavity, orofarynx, hypopharynx, larynx and nasopharynx, but have in common an etiological association with tobacco and/or alcohol exposure. Treatment planning for HNSCC depends largely on anatomical staging of the disease at presentation. Conventional treatment with surgery and/or radiation therapy and/or chemotherapy is associated with significant morbidity affecting overall quality of life. Despite advances in treatment, the survival rate for patients with HNSCC has not improved significantly in the past 20 years, remaining at 50% approximately. In order to gain insight into molecular events on HNSCC, 53 genes differently expressed were identified in larynx tumors through array approach, of which 9 molecular markers resulting of semi-quantitative and quantitative analyses were studied. These markers are the genes *BCL2L11*, *MTCYB*, *RPS25*, *Set translocation*, *RPL15*, *DOT1L*, *ARTS1* and the sequences *No Match 2* and *Hs.344000*, which are classified mainly within 2 gene categories: cellular metabolism and cell growth, development and maintenance.

Autorizo a reprodução deste trabalho
São José do Rio Preto, 18/02/2004

Paola Jocelan Scarin Provazzi



