



JUCIMARA COLOMBO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM CÂNCER DE LARINGE**

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Tese apresentada para
obtenção do Título de Doutor
em Genética

São José do Rio Preto

2007

Colombo, Jucimara.

Identificação de genes diferencialmente expressos em câncer de laringe / Jucimara Colombo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007.
147 f. : il. ; 30 cm.

Orientado: Paula Rahal

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas

1. Câncer – Aspectos genéticos. 2. Laringe – Câncer – Aspectos genéticos. 3. Expressão gênica - Análise. 4. Microarray. 5. RT-PCR em tempo real. I. Rahal, Paula. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-006.6

JUCIMARA COLOMBO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM CÂNCER DE LARINGE**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador:.....

2º Examinador:.....

3º Examinador:.....

4º Examinador:.....

5º Examinador:.....

São José do Rio Preto, ____/____/____

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular e Laboratório de Estudos Genômicos, ambos do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; e no Laboratório de Expressão Gênica de Eucariotos, do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química da USP de São Paulo-SP, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CPNq).

Dedico este trabalho:

Aos meus queridos e inesquecíveis pais Manoel Colombo (in memorian) e Helena Mulinari Colombo (in memorian) por me acolherem, me amarem, me darem oportunidades para a realização dos meus sonhos e me transmitirem seus valores, os quais me tornaram a pessoa que sou.

A eles o meu eterno amor e gratidão.....

Agradecimentos

A realização desse trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, em especial agradeço:

Principalmente à minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Paula Rahal, pelo seu exemplo de dedicação e competência, por ter acreditado no meu trabalho e nos meus sonhos e ter me oferecido grandes oportunidades, o que contribuiu imensamente para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, do Instituto de Química da USP em São Paulo-SP, exemplo de profissionalismo e dedicação e cuja ajuda foi imprescindível para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini, ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, à Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza e ao Prof. Dr. Paulo Peitl Júnior, pela disponibilidade em participar como membros da banca examinadora, contribuindo para o aprimoramento e enriquecimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Ana Elizabete Silva por ter acompanhado o meu trabalho desde a graduação, pelos ensinamentos e amizade e por ter contribuído muito para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Verjovisk-Almeida, do Instituto de Química da USP em São Paulo-SP, por permitir minha permanência em seu laboratório e oferecer condições para que esse trabalho fosse realizado.

À doutoranda Ângela Fachel, do Instituto de Química da USP em São Paulo-SP, pela inestimável ajuda na realização das técnicas e pela amizade construída.

A Dr. Érica Erica Fukuyama, do Hospital Arnaldo Vieira de Carvalho em São Paulo-SP, pela coleta das amostras utilizadas nesse trabalho.

A Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP, pela prontidão na microdissecção das amostras.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP, pela valiosa orientação na análise estatística.

Às biólogas, Adriana Matsukuma e Denise Yamamoto, do Instituto de Química da USP em São Paulo, pela inestimável ajuda na realização da técnica de *microarray*.

À doutoranda e amiga Paola Jocelan Scarin Provazzi, por ter fornecido parte das amostras utilizadas nesse trabalho.

À também doutoranda e amiga Marília de Freitas Calmon, pelo auxílio no desenho dos *primers* utilizados na técnica de PCR em tempo real.

À mestranda e amiga Cíntia Bittar, pela ajuda oferecida na revisão em inglês do artigo.

Às Coordenadoras da Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, por todo o apoio oferecido.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem para meu crescimento profissional.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, pelos anos de convivência agradável.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial a secretária Simone Carvalho Fernandes, que acompanha a minha formação desde a graduação.

Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação, em especial, Rosemar Rosa Carvalho, Rosana Miguel Gomes Ferro e Sílvia Emiko Kazama, pela simpatia e atenção com as quais sempre me receberam.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas.

À direção do IBILCE-UNESP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e auxílio financeiros à pesquisa, os quais contribuíram imensamente para a realização desse trabalho.

A todos os pacientes, que despretenciosamente aceitaram participar desse trabalho.

À Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, do laboratório de Estudos Genômicos, pelo incentivo e pelo seu exemplo de profissionalismo.

Às doutorandas Ana Carolina Gomes Jardim e Erica Babeto, pelos conhecimentos compartilhados e pelos anos de convivência e amizade.

Aos queridos amigos do laboratório de Estudos Genômicos, Caroline, Luiz Gustavo, Marcelo, Marina, Lílian Pires, Lílian Yamasaki, Paulo e Sérgio, pelos momentos de descontração passados juntos, o que tornaram menos árduo esse trabalho.

À secretaria do laboratório de Estudos Genômicos, Lenira Bueno, por toda a ajuda prestada, pela simpatia e pela amizade.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Expressão Gênica de Eucariotos do Instituto de Química da USP, Lauren, Helder, Camila, Rodrigo, Glauber, Ana Cláudia, Kátia, Júlio, Ricardo, Giuliana, Ana Paula, Jéferson e Tarik, pela simpatia com a qual me receberam.

Às queridas amigas, Alessandra Teodoro Laranja, Giovana Mussi Polachini, Marlucci Monteiro Guirado e Carmem Barbosa, pela grande amizade construída, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas alegrias compartilhadas.

À Silmara Fernandes Rodrigues Ligeiro por todo o apoio oferecido e pelo incentivo, os quais foram muito importantes para a conclusão desse trabalho.

As minhas tias amadas, Gentil, Alvina e Josefina e aos primos Mário, Bruno e Tatiana pelas lembranças felizes de Campinas e por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao Krikor, meu namorado, pelo seu amor, carinho, amizade e compreensão, e a sua família, pela forma carinhosa de acolhida e por estarem fazendo parte da minha vida.

A toda a minha família por contribuir direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A Deus pela oportunidade de crescimento e evolução, pela vida.....por tudo.

Tocando em frente

*Ando devagar
Porque já tive pressa
Levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe,
Só levo a certeza, de que muito pouco eu sei,
Ou nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor para poder pulsar
É preciso paz para poder sorrir
É preciso a chuva para florir
Sinto que seguir a vida seja simplesmente conhecer a marcha
Ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada
Eu vou
Estrada eu sou
Todo mundo ama um dia
Todo mundo sofre
Um dia a gente chega
No outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua própria história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz.....*

Almir Sater e Renato Teixeira

*“...Plante seu jardim e decore sua alma,
ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.....
E você aprende que realmente pode suportar... que
realmente é forte, e que pode ir mais longe,
depois de pensar que não pode mais.....”*

William Shakespeare

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
ADCY6	Adenylate cyclase 6
AES	Amino-terminal enhancer of split
ALG-2	(PDCD6IP) Programmed cell death 6 interacting protein
ALS2CR3	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosome region, candidate 3
AP-1	Adaptor-related protein complex 1
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
c/EBP	(DDIT3) DNA-damage-inducible transcript 3
CAGB	Calgranulin B
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCND1	Cyclin D1
cdk	cyclin dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese hamster ovary
c-jun	(MAPK9) Mitogen-activated protein kinase 9
CLK1	CDC-like kinase 1
c-myb	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
c-myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
Cox 1	Cyclo-oxygenase 1
Cox 2	Cyclo-oxygenase 2
CRR9	Cisplatin resistance related protein
CSTB	Cystatin B
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
DAXX	Death-associated protein 6
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
E2F	E2 promoter-binding factor 1
EGFR	Epithelial growth factor receptor
EHF	Ets homologous factor
ESTs	Expressed sequence tag
Fas	TNF receptor superfamily

FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GABA _A	Gamma-aminobutyric acid
GRIF-1	(GABA _A) receptor interacting factor-1
GSTM1	Glutathione S-transferase M1
GSTT1	Glutathione S-Transferase T1
HER2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HER3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Human Papillomavirus
H-ras	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HST-1	Heparin secretory transforming protein 1
IL18BP	Interleukin 18 binding protein precursor
IL-6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
Int-2	FGF-3 (Fibroblast growth factor 3)
Jab1	Jun activation domain-binding protein 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KDa	Kilodalton (molecular mass)
LEKT1	Lymphoepithelial kazal-type-related inhibitor
LOH	Loss of heterozygosity
MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
MDM2	Mouse double minute 2
MKP-1	Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
MMPs	Matrix metalloproteinases
MT1-MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase 1
NF-kappa β	Nuclear factor kappa β
ORESTES	Open reading frame expressed sequence tags
p38 MAPK	p38 Mitogen activated protein kinase
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PAI-I	Plasminogen activator inhibitor-1
PLAT	Plasminogen activator tissue type
PLAU	Plasminogen activator urokinase type
PRAD1	Parathyroid adenomatosis 1
pRB	Retinoblastoma protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPRS	Protein tyrosine phosphatase receptor type sigma
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)
RAD52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)

Raf	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SAGE	Serial analysis of gene expression
SUMO1	Small ubiquitin-related modifier
Tcf	T cell factor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TGF- α	Transforming growth factor- α
TGM3	Transglutaminase 3
TIMPs	Tissue inhibitors of MMPs
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TRAF-2	TRF (TRK-fused gene)
TRAK2	Trafficking protein kinesin binding 2
UBL1	Ubiquitin-like 1
u-PAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WAF1/CIP1	CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family
XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 5
ZNF185	Zinc finger 185
ZNF212	Zinc finger 212
ZNF262	Zinc finger 262
ZNF273	Zinc finger 273
ZNF706	Zinc finger 706

RESUMO

Os tumores de cabeça e pescoço ocupam, mundialmente, a quinta posição na lista das neoplasias mais freqüentes. O tipo histológico predominante é o carcinoma de células escamosas, que acomete a cavidade oral, a orofaringe, a hipofaringe e a laringe. O tumor de laringe é um dos tipos mais comuns, correspondendo a 25% dos casos, com alto índice de mortalidade e prognóstico reservado. O principal fator etiológico para o seu desenvolvimento é o consumo combinado de álcool e fumo. O desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço é um processo multipasso acompanhado por mudanças genéticas e epigenéticas. Recentemente, estudos envolvendo a tecnologia *microarray* têm identificado genes específicos, cuja expressão está alterada em câncer de cabeça e pescoço quando comparado ao tecido normal. No entanto, a maioria dos estudos são realizados usando tumores de diferentes sítios. Neste estudo, foi analisado somente amostras de carcinoma de laringe para minimizar as diferenças genéticas. Dessa forma, os objetivos do presente projeto foram identificar e validar possíveis biomarcadores moleculares envolvidos na carcinogênese de laringe. Para tanto, foi construído um cDNA *microarray* com 340 genes previamente identificados pelo *Head and Neck Annotation Consortium*. A expressão desses genes foi analisada em 8 amostras de tecido tumoral e em 4 amostras de tecido histologicamente normal de laringe pela técnica de *microarray*. Foram identificados 35 genes diferencialmente expressos ($\text{SNR} \geq |1.0|$, $p\text{-value} \leq 0.001$), os quais estão envolvidos em diversos processos celulares como adesão celular, apoptose, ciclo celular, inibição de proteases, metabolismo, proteólise, reparo de DNA, regulação da transcrição e transdução de sinal. A robustez da assinatura dos 35 genes diferencialmente expressos foi confirmada em um conjunto adicional de 5 amostras tumorais e 6 amostras histologicamente normais. Para a validação por RT-PCR em tempo real, foram selecionados 14 genes, dos quais dez (*ADCY6*, *AES*, *AL2SCR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* e *ZNF706*) foram validados como diferencialmente expressos e participam de diferentes vias metabólicas, como apoptose, ciclo celular, inibição de proteases, proteólise, regulação da transcrição e reparo de DNA. Entre os genes validados destaca-se o gene *CSTB*, que tem atividade inibidora de protease de cisteína e portanto atividade anti-metastática e mostrou baixa expressão em todas as amostras de tumores analisadas ($p\text{-value} = 0.000$). Estes resultados podem ajudar na compreensão da base molecular do câncer de laringe, fornecendo subsídios para diagnósticos e prognósticos mais efetivos, bem como para novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, câncer de laringe, expressão gênica, cDNA *microarray*, RT-PCR em tempo real, *CSTB*

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common cancer world-wide. More than 90% of this cancer type has a squamous origin and common sites include oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. Laryngeal squamous cell carcinoma is very common in head and neck cancer, corresponding to 25% of cases, with high mortality rates and poor prognosis. Tobacco use and/or alcohol consumption are the two principal risk factors involved in development of HNSCC. The development of head and neck cancer is a multistep process accompanied by genetic and epigenetic changes. In recent years, studies involving microarrays have identified specific genes whose expression has changed in head and neck cancer compared with normal tissue. However, most microarray studies are performed using tumors from different sites in head and neck. In our study, we analyzed only larynx carcinoma samples to minimize the genetic differences. Thus, the purpose of this work was to identify and to validate molecular biomarkers involved in larynx carcinogenesis. Therefore, we constructed a cDNA microarray containing 340 genes previously identified by Head and Neck Annotation Consortium. Expression analysis was applied to 8 larynx tumor samples and 4 larynx normal samples. We identified 35 differentially expressed genes between tumor and non-tumor adjacent tissue of larynx ($\text{SNR} \geq |1.0|$, $p\text{-value} \leq 0.001$). Genes detected were involved in processes as apoptosis, cell adhesion, cell cycle, DNA repair, metabolism, protease inhibition, proteolysis, signal transduction and transcription regulation. The robustness of the 35-gene signature was confirmed using data from an additional set of 5 larynx tumor samples and 6 adjacent non-tumor larynx tissues. For real time RT-PCR validation we selected fourteen genes, of which 10 (*ADCY6*, *AES*, *AL2SCR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* and *ZNF706*) were validated. These genes participate of distinct metabolic pathways as apoptosis, cell cycle, DNA repair, protease inhibition, proteolysis and regulation transcription. Among the genes validated, we emphasize *CSTB* gene that has cysteine protease inhibitor activity, *i.e.*, anti-metastatic function, and showed low expression in all tumor samples analyzed ($p\text{-value} = 0.000$). These findings may help to form the basis for a molecular comprehension of larynx cancer, thus improving diagnosis, treatment and outcome for patients with this carcinoma.

Keywords: head and neck cancer, larynx carcinoma, gene expression, cDNA microarray, real time RT-PCR, *CSTB*

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO.....	17
A. Câncer de Cabeça e Pescoço: aspectos epidemiológicos, clínicos e genéticos.....	18
B. A tecnologia de <i>microarray</i> no estudo do câncer de cabeça e pescoço.....	34
C. Busca por biomarcadores moleculares em câncer de laringe.....	43
Objetivos.....	47
II – ARTIGO ORIGINAL: Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by microarray analysis.....	48
III – DISCUSSÃO.....	96
A. Aspectos epidemiológicos do câncer de laringe.....	97
B. Análise de expressão gênica em câncer de laringe pelas técnicas de <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real.....	99
IV – CONCLUSÕES.....	117
V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
VI – ANEXO I.....	137
VII – OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.....	147

I - INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

A. Câncer de cabeça e pescoço: aspectos epidemiológicos, clínicos e genéticos

O câncer de cabeça e pescoço ocupa a quinta posição na lista das neoplasias mais freqüentes, com uma incidência mundial estimada de 780.000 novos casos por ano (Lothaire et al., 2006). O principal tipo histológico é o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), correspondendo a cerca de 90% dos casos (Chung et al., 2006). Os sítios anatômicos que estão incluídos nesse grupo de neoplasias constituem: a cavidade oral, que compreende mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua, soalho de língua; faringe, que inclui orofaringe, nasofaringe, hipofaringe; fossa nasal e seios paranasais; laringe glótica e supraglótica; e glândulas. A ocorrência aproximada é de 40% na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe, sendo o restante nos demais sítios remanescentes (Canevari & Rogatto, 2004; Döbrossy, 2005).

Esse grupo de neoplasias é mais freqüente no sexo masculino do que no feminino. No Brasil, as estimativas referem-se apenas ao câncer oral, sendo que foram estimados para 2006, 10.060 novos casos de câncer oral entre os homens e 3.410 entre as mulheres, ocupando dessa forma, a sétima posição entre as neoplasias mais freqüentes no Brasil (INCA, 2006).

O principal fator etiológico para o seu desenvolvimento é o consumo combinado de tabaco e álcool, os quais são mencionados conjuntamente porque fumantes tendem a ser etilistas e vice-versa (Roepman et al., 2005; Ragin et al., 2007).

Outros co-fatores que podem contribuir para a carcinogênese de cabeça e pescoço, incluem a poluição ambiental e certas condições de trabalho associadas à indústrias como a metalurgia e a petroquímica, assim como a nutrição, a má dentição e a predisposição e

a suscetibilidade genética (Döbrossy et al. 2005). Alguns estudos também têm demonstrado que infecção por HPV (*Human Papillomavirus*), principalmente dos tipos 16 e 18, e Epstein-Barr virus, também desempenham papel na etiologia do HNSCC, especialmente nas regiões nasofaríngeal e orofaríngeal (Goldenberg et al., 2001; Syrjänen et al., 2005; Ragin et al., 2007)

Em relação à nutrição, estudos epidemiológicos relatam que o consumo de frutas e de vegetais ricos em vitaminas A e C e em betacaroteno, estão inversamente relacionados ao risco de câncer oral, enquanto a carne e a pimenta vermelha são consideradas fatores de risco (Sanchez et al., 2003; Döbrossy et al., 2005).

Embora seja bem aceito o fato de que há uma elevação da incidência de HNSCC com a idade, sendo 64 anos a média de idade de apresentação da doença, alguns trabalhos relatam aumento do número de casos de câncer oral em jovens, mesmo entre aqueles que não consomem álcool e fumo, o que reforça a participação de outros fatores etiológicos na carcinogênese de cabeça e pescoço, como por exemplo, a predisposição e a suscetibilidade genética (Gilroy et al., 2005).

Os pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço freqüentemente 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.

O estabelecimento do planejamento terapêutico e do prognóstico dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço baseiam-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, os quais consistem no local do tumor primário e no sistema de estadiamento TNM, ou seja, no tamanho do tumor, na presença de metástase em linfonodos cervicais e de metástase à distância (Chung et al., 2004). É bastante aceito que a

presença de metástase em linfonodos cervicais é o principal fator prognóstico adverso independente (Thomas et al., 2005; Lothaire et al., 2006). O câncer de laringe, especialmente o supra-glótico, frequentemente apresenta infiltração local e metástase em linfonodos cervicais (Licitra et al., 2003). No entanto, tumores apresentando o mesmo estadiamento clínico podem demonstrar padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de outros fatores complementares capazes de nortear com maior precisão o prognóstico da doença (Worsham et al., 2003).

Dessa forma, apesar das abordagens de tratamento agressivas e multidisciplinares, o índice de sobrevivência de 5 anos permanece inalterado nos últimos 40 anos e apenas 30 a 40% dos pacientes atingem tal índice (Hunter et al., 2005). As falhas no tratamento ocorrem na forma de recorrência locorregional, a qual afeta aproximadamente 60% dos pacientes, metástase à distância desenvolvida em 15 a 25% dos pacientes, bem como o aparecimento de um segundo tumor primário (Choi & Chen, 2005).

Como as neoplasias de cabeça e pescoço consistem em um grupo de tumores muito heterogêneos, com características clínicas diferentes, nos últimos anos têm sido investigados marcadores moleculares que auxiliem no seu diagnóstico precoce e prognóstico, assim como na identificação de populações de risco e de marcadores que possam ser utilizados como alvos terapêuticos (Hartmann et al., 2002; Tomioka et al., 2006).

A combinação de fatores prognósticos já estabelecidos a parâmetros moleculares podem trazer benefícios aos pacientes. Nesse sentido, fatores prognósticos com maior sensibilidade e especificidade poderiam oferecer certamente subsídios para novas estratégias terapêuticas. A utilização de marcadores moleculares apresenta-se também como um promissor auxílio na detecção do câncer nos estádios mais precoces, ou eventualmente lesões pré-invasivas, favorecendo os pacientes não apenas com a elevação da sobrevida, mas também pela utilização de tratamentos associados a menor morbidade. Os marcadores moleculares também exercem importante função no seguimento dos pacientes, uma vez que a

recidiva tumoral, bem como a possibilidade de cura podem ser avaliadas (Belbin et al., 2002; Chung et al., 2006).

Califano et al. (1996) e Mao et al. (1997) mostraram que o aparecimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço está associado com alterações na estrutura cromossômica. Os estudos citogenéticos moleculares têm evidenciado várias regiões cromossômicas consistentemente alteradas nesses tumores, envolvendo ganhos em 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q13 e 20q e perdas em 3p, 5q, 8p, 9p, 13q, 18q, 21q. Entre as alterações estruturais recorrentes, podemos citar isocromossomos do 8q, deleções do 3p e regiões homogeneamente coradas em 11q13, sendo as perdas de 3p e 9p consideradas eventos precoces na tumorigênese de cabeça e pescoço (Canevari & Rogatto, 2004; Belbin et al., 2005).

Scully et al. (2000a, 2000b, 2000c) publicaram revisões detalhadas a respeito dos fatores genéticos e moleculares associados com o carcinoma de células escamosas, com considerações dos modelos metabólicos da carcinogênese, fatores envolvidos no reparo de DNA, ciclo celular, anormalidades cromossômicas e possíveis aplicações clínicas.

Vários outros estudos citogenéticos e moleculares também investigaram a ocorrência de alterações genéticas em tumores de cabeça e pescoço, demonstrando que ativação de oncogenes, tais como *PRAD-cyclinD1*, *H-ras*, *c-myc*, *EGFR*; e inativação de genes supressores de tumor, como *P16*, *TP53*, *P21* estão envolvidos no desenvolvimento da doença (Gleich & Salomone, 2002; Peschos et al 2005; Thomas et al., 2005; Lothaire et al., 2006).

Genes envolvidos na proliferação celular

Os oncogenes codificam proteínas que promovem a perda de controle de crescimento e a conversão de uma célula a um estado maligno. Os oncogenes são derivados de proto-oncogenes, os quais são genes que codificam proteínas que têm uma função na célula normal. A maioria dos proto-oncogenes participa no controle do crescimento celular,

incluindo a estimulação do crescimento por ligantes externos, a transdução de sinal ou a progressão do ciclo celular (Karp, 2005).

O gene do receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*), localizado em 7p12, codifica um receptor transmembrana que liga-se ao fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e outras proteínas regulatórias. A família EFGR inclui: EFGR, HER-2/neu (c-erbB), HER-3 (c-erbB-3) e HER-4 (c-erbB-4) (Ford & Grandis, 2003).

Os eventos de sinalização acionados após a ligação de EGFR aos seus ligantes incluem ativação de tirosina quinase e ativação de Ras intracelular, Raf (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*) e cascatas de proteínas quinases que estão envolvidas na transformação maligna e crescimento do tumor por meio da inibição de apoptose, proliferação celular, promoção da angiogênese e metástase (Thomas et al., 2005).

A expressão de *EGFR* tem sido extensivamente estudada em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e sua superexpressão tem sido observada em 34 a 80% dos casos, utilizando técnicas de imuno-histoquímica. Esse marcador tem sido significativamente associado com sobrevivência global e sobrevivência livre de doença reduzidas, bem como prognóstico reservado em pacientes com HNSCC, principalmente em tumores de laringe (Putti et al., 2002; Lothaire et al., 2006; Sok et al., 2006).

A superexpressão de *EFGR* também tem sido associada com recidiva em nódulos cervicais e aumento da resistência do tumor a quimioterapia e radioterapia em pacientes com carcinoma de laringe. Esses dados sugerem que a avaliação da expressão de *EFGR* no momento do diagnóstico pode ajudar a identificar pacientes que têm risco aumentado de metástases cervicais e que seriam beneficiados com a realização de tratamentos mais agressivos (Milas et al., 2004; Kalyankrishna et al., 2006).

Embora outros estudos não tenham encontrado associação entre *EFGR* com fatores prognósticos e estágio clínico (Wen et al, 1996; Ulanovski et al., 2004), o significado

prognóstico de *EFGR* em HNSCC, em um grande número de estudos, tem dirigido o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para bloquear o sistema de transdução de sinal de *EFGR* e teoricamente diminuir o desenvolvimento tumoral (Laskin & Sandler, 2004; Chung et al., 2006; Sok et al., 2006)

As ciclinas são extremamente importantes durante o ciclo celular e são divididas em quatro tipos: A, B, D e E. A *ciclina D1* também chamada de *PRAD1* é um proto-oncogene que responde a mitógenos extracelulares e é um controlador da progressão da fase G1 no ciclo celular. O complexo cdk4/6-ciclina D1 estimula a progressão do ciclo celular por fosforilar a proteína pRB. A fosforilação de pRB por tais complexos em G1 promove a liberação de fatores de transcrição, tais como E2F, que induz a expressão gênica e mudanças metabólicas levando à replicação do DNA. Dessa forma, a ciclina D1 é essencial para a progressão da fase G1 do ciclo celular (Koontongkaew et al., 2000; Hardisson, 2003).

A mais comumente alteração de ciclina D1 é a amplificação do gene localizado em 11q13, região cromossômica na qual já foram identificados outros proto-oncogenes como *int-2*, *hst-1*, *sem-1*, *EMS-1* (Namazie et al., 2002). A amplificação do gene resulta na superexpressão de uma proteína estruturalmente normal, mas em níveis altos que levam a célula a um estado de proliferação descontrolada. A amplificação e/ou a superexpressão de Ciclina D1 tem sido encontrada em cerca de 17-70% das amostras de HNSCC utilizando técnicas de imuno-histoquímica, FISH ou RT-PCR (Kumar et al, 2003; Volavsek et al., 2003; Nimeus et al., 2004).

A amplificação e/ou superexpressão da proteína ciclina D1 estruturalmente normal têm sido significativamente correlacionada com a extensão do tumor, a metástase em linfonodos regionais e o estágio clínico avançado (Cappacio et al., 2000; Gleich & Salomone, 2002). Outros estudos também têm evidenciado que alterações em ciclina D1 constituem um marcador de prognóstico de sobrevivência livre de doença e sobrevivência global reduzidas (Namazie et al., 2002). No entanto, outros estudos não mostraram associação entre alterações

de ciclina D1 e sobrevivência em pacientes com carcinoma de células escamosa de cabeça e pescoço (Vielba et al., 2003).

As enzimas ciclo-oxigenases (Cox) catalizam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. Duas isoformas de ciclo-oxigenases foram descritas, Cox-1 e Cox-2. Embora a Cox-1 seja constitutivamente expressa em vários tecidos, a expressão de Cox-2 é mais restrita e pode ter um importante papel na progressão do carcinoma de cabeça e pescoço (Lin et al., 2002). A expressão de Cox-2 pode ser induzida por vários estímulos, incluindo uma variedade de citocinas, hormônios e agentes mutagênicos como o benzopireno (Goodin & Shiff, 2004). A enzima Cox-2 contribui para a carcinogênese por catalizar a síntese de mutágenos; diminuir o índice de apoptose; estimular a inflamação, a imunossupressão e a angiogênese; e por aumentar o potencial de invasão e metástase (Dohadwala et al., 2001; Hunter et al., 2005).

Expressão citoplasmática de Cox-2 tem sido observada em 70-88% das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço utilizando técnicas de imuno-histoquímica e em 87% das amostras usando RT-PCR (Peng et al., 2002; Sudbo et al., 2003). Além disso, alguns estudos mostram que a expressão de Cox-2 é significativamente aumentada em amostras de pacientes com metástase em linfonodos cervicais e em tumores avançados, assim como em tumores pouco diferenciados. A expressão de Cox-2 também tem se revelado um marcador de prognóstico significativo em pacientes com lesões pré-malignas e um preditor independente para intervalo livre de doença (Cho et al., 2004; Nystrom et al., 2006). De modo contrário, estudos realizado por Ranelletti et al (2001) e Bayazit et al. (2004) não encontraram correlação entre a expressão de Cox-2 e os parâmetros clínicos e prognósticos em pacientes com carcinoma de laringe. Apesar desses resultados, numerosos estudos em outros tipos de neoplasias sugerem que a atividade de Cox-2 é importante na progressão de neoplasias epiteliais.

Genes envolvidos na supressão tumoral

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que atuam como reguladoras negativas da proliferação celular e impedem as células de se tornarem malignas. Entre os genes incluídos nessa categoria estão aqueles que codificam fatores de transcrição, proteínas reguladoras do ciclo celular e de vias de sinalização (Karp, 2005).

O gene supressor de tumor *TP53*, localizado em 17p13, está envolvido em muitas funções relacionadas à manutenção da integridade celular após danos ao DNA e controle do ciclo celular. As disfunções desse gene estão envolvidas em muitos tipos de tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço (Gleich & Salamone, 2002; Hardisson, 2003).

A produção da proteína p53 é aumentada em resposta a danos no DNA, induzindo parada no ciclo celular na transição G1/S. No entanto, se o dano for irreparável, a proteína p53 pode iniciar a morte celular por apoptose. Em células normais, a concentração de p53 é baixa e sua meia vida é curta, por volta de 20 minutos. De modo contrário, se o gene *TP53* estiver mutado, o seu produto protéico está freqüentemente presente em altas concentrações (Edstrom et al., 2001).

Mutações no gene *TP53*, principalmente nos exons 5-8 ou 5-9, têm sido registradas em cerca de 60% dos casos de câncer de cabeça e pescoço, e podem ser mutações de ponto como deleções, inserções ou substituições. Alguns estudos têm mostrado que mutações desse gene estão associadas com aumento do risco de recorrência loco-regional e prognóstico reservado (Mineta et al., 1998; Pechos et al., 2005). Outros estudos sugerem também que a superexpressão da proteína p53 mutada está associada com índices reduzidos de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença em pacientes com HNSCC, principalmente câncer de laringe (Nylander et al., 2000. Khademi et al., 2002; Vielba et al., 2003; De Vicente et al., 2004).

No entanto, a correlação entre expressão da proteína p53 e evolução clínica em pacientes com HNSCC permanece bastante controversa. Embora muitos estudos tenham

correlacionado mutações e/ou superexpressão de p53 com prognóstico reservado, outros têm mostrado que estes eventos são independentes do prognóstico e da evolução clínica da doença (Friedman et al., 2001; Pukkila et al., 2002; Samardova et al., 2004).

Além de eventos mutacionais, outros mecanismos de inativação, tais como presença de HPV e desregulação em outros componentes da cascata de sinalização, têm sido registrados. Em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço positivos para HPV, isto pode ocorrer por meio da interação de p53 com a proteína E6 codificada pelos tipos oncogênicos de HPV, principalmente HPV 16 e 18. Outros mecanismos envolvem a proteína *mouse double minute 2* (MDM2) que liga-se a p53 e promove a ubiquitinização da região C-terminal de p53 e sua subsequente degradação (Gasco & Crook, 2003)

A proteína p16 é codificada pelo gene supressor tumoral *CDKN2A*, localizado em 9p21. A proteína p16 liga-se às quinases dependentes de ciclina (cdks) 4 e 6, inibindo sua associação com a ciclina D1. A inibição do complexo cdk4/6-ciclina D1 previne a fosforilação da pRB, levando conseqüentemente à inibição da transição G1/S do ciclo celular (Coon et al., 2004).

A perda de expressão do gene *P16*, por deleções homozigotas e eventos epigenéticos, como metilação, estão presentes em 52 a 82% das amostras de HNSCC e pode ser observada usando técnicas como imuno-histoquímica e RT-PCR. Essas alterações têm sido associadas com desenvolvimento de metástase a distância e diminuição da sobrevida dos pacientes (Ambrosch et al., 2001; Namazie et al., 2002). Além disso, estudo realizado por Bazan et al. (2002) considerou que mutações no gene *p16* constituem um fator preditivo independente para recidiva da doença.

Contudo há resultados conflitantes há respeito do significado prognóstico do gene *P16* em câncer de cabeça e pescoço, pois outros estudos não confirmam a associação entre perda de expressão desse gene com desenvolvimento de metástase e sobrevida reduzida dos pacientes (Danahey et al., 1999, Yuen et al., 2002). Estudos pré-clínicos utilizando RNA

de interferência, o qual consiste em um mecanismo de silenciamento gênico, podem ajudar a elucidar o significado e importância da perda de expressão de *p16* em células humanas (Shin et al., 2004).

O inibidor de quinase dependente de ciclina $p21^{WAF1/CIP1}$ codificado pelo gene *WAF1/CIP1*, localizado em 6p21.2, tem um papel importante na regulação da transição G1/S do ciclo celular. A proteína $p21^{WAF1/CIP1}$ atua como um dos principais efetores responsivos da proteína p53. Em resposta a danos no DNA a proteína p53 selvagem acumula e liga-se na região promotora do gene *WAF1/CIP1* e induz a expressão da proteína $p21^{WAF1/CIP1}$, a qual inibi a atividade dos complexos quinase dependente de ciclina, levando à parada do ciclo celular. A expressão da proteína $p21^{WAF1/CIP1}$ também pode ser induzida por uma via independente de p53, tais como drogas genotóxicas e fatores de crescimento. Esse gene também tem sido implicado nos mecanismos de apoptose e senescência celular (Child & Mann, 2006).

Mutações de *WAF1/CIP1* frequentemente ocorrem em tumores malignos, sendo que a proteína mutada é incapaz de bloquear o ciclo celular e acumula-se no núcleo da célula. O acúmulo da proteína no núcleo pode ser observado por imuno-histoquímica. Alguns estudos indicam que superexpressão da proteína $p21^{WAF1/CIP1}$ mutada está associada com prognóstico reservado em câncer de bexiga, ovário, mama e câncer de cabeça e pescoço (Rose et al., 2003; Garcia del Muro et al., 2004; Goan et al., 2005; Ping et al., 2006). Dessa forma, em estudo realizado por Nemes et al. (2005) foi observada uma correlação positiva entre superexpressão de $p21^{WAF1/CIP1}$ e prognóstico reservado, bem como maior grau de agressividade em carcinoma oral.

No entanto, o seu papel como preditor de prognóstico em neoplasias permanece controverso, pois outros estudos não apóiam a associação de superexpressão de $p21^{WAF1/CIP1}$ com prognóstico reservado em tumores malignos (Przybojewska et al., 2003; Liu et al., 2004).

O gene *P27* ou *Kip1*, localizado em 12p13.1-p12, é um inibidor de quinase dependente de ciclina, que regula negativamente a progressão da fase G1 do ciclo celular pela ligação ao complexo ciclina E/quinase dependente de ciclina 2. A proteína p27 é ativada em resposta a sinais extracelulares como inibição por contato, TGF- β , AMP cíclico. Os níveis da proteína p27 estão aumentados em células quiescentes e diminui rapidamente após a célula ser estimulada por mitógenos. A abundância celular dessa proteína é regulada primariamente em nível pós-traducional pelo sistema ubiquitina-proteosoma (Kaldis, 2007).

A expressão reduzida da proteína p27 tem sido associada com progressão em lesões pré-cancerosas da laringe, indicando *p27* como um potencial gene supressor tumoral (Hirai et al., 2003). Em estudo realizado por Choi et al., 2001, uma correlação significativa foi encontrada entre a baixa expressão de p27 e tumores de cabeça e pescoço de alto grau, estágios T avançado e a presença de metástase em linfonodos cervicais.

Adicionalmente, estudos recentes indicam que a proteína Jab1 (*human Jun activation domain-binding protein 1*), a qual foi originalmente identificada como um co-ativador do gene *AP-1* envolvido no controle da proliferação celular, participa também da degradação da proteína p27 via sistema ubiquitina-proteosoma, sendo a sua expressão inversamente associada com o nível de p27 (Tomoda et al., 2002). Estudos indicam ainda que a combinação de expressão aumentada de Jab1 e baixa expressão de p27 estão associadas com variáveis clínicas desfavoráveis como sobrevivência global e sobrevivência livre de doença baixas e metástase em linfonodos em alguns tipos de neoplasias, dentre elas câncer de cabeça e pescoço, especialmente tumor de laringe (Dong et al., 2005).

Genes envolvidos em angiogênese

Angiogênese é o processo de formação de novos capilares a partir de vasos pré-existent, e seu processo depende da motilidade, proliferação e formação de células endoteliais, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário, formação de órgãos,

reprodução, regeneração e remodelação tecidual. Sob certas condições patológicas, como carcinogênese, um fenótipo angiogênico pode ocorrer devido a superexpressão de fatores angiogênicos e a baixa expressão de inibidores de angiogênese. Estudos recentes indicam que a aquisição de um fenótipo angiogênico ocorre antes do tumor adquirir propriedades invasivas, sendo portanto, essencial para o crescimento local do tumor, bem como para o desenvolvimento de metástase (Gingras et al., 2004a; Shim et al., 2005).

A família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) contém proteínas altamente potentes e específicas que atuam no aumento da permeabilidade dos vasos, crescimento, proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais, por meio da ligação aos seus receptores celulares, os quais têm atividade tirosina quinase (Thomas et al., 2005).

Os níveis de VEGF em pacientes com HNSCC têm sido estudados usando técnicas de imuno-histoquímica (Thomas et al., 2005). Expressão aumentada de VEGF-A e VEGF-C, os quais atuam na regulação da linfangiogênese, tem sido observada em linhagem celular e em amostras clínicas de pacientes com HNSCC (Shintani et al., 2004). Estudos indicam ainda que os níveis de VEGF-A e/ou VEGF-C em neoplasias de cabeça e pescoço em estágio inicial são fatores preditivos independentes para metástase em linfonodos cervicais (Sedivy et al., 2003; Onesto et al., 2006). A expressão aumentada dessas proteínas também tem sido associadas com sobrevivência global reduzida em pacientes com HNSCC em estágio avançado, isto levanta a possibilidade de que a avaliação dos níveis de VEGF-A e VEGF-C em HNSCC inicial pode ajudar a identificar pacientes com risco elevado de metástase, podendo dirigi-los para tratamentos mais apropriados (Onesto et al., 2006).

No entanto, alguns estudos têm questionado o valor prognóstico de VEGF e seu papel em promover comportamento invasivo e agressivo em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Tae et al., 2000; Artese et al., 2001; Schimming et al.,

2004). Um fator que contribui para esses resultados discrepantes é a falta de técnicas diretas para medir a atividade angiogênica nos tecidos.

Genes envolvidos em metástase

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes do zinco que estão envolvidas na degradação e remodelação de componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina, fibronectina e gelatina. A família é subdividida em collagenases, gelatinases, estromelisinases, MMP tipo estromelisinases e MMP tipo membrana. Vários estudos têm evidenciado que as MMPs atuam na quebra da membrana basal e na degradação do estroma intersticial e dessa forma facilitam a invasão das células tumorais e, conseqüentemente, a metástase (Thomas et al., 2005).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado, por meio de técnicas de imuno-histoquímica ou RT-PCR, que carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço expressam altos níveis de MMPs *in vivo*. As MMPs consistentemente encontradas superexpressas em câncer de cabeça e pescoço incluem MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13 e MMP-14. As enzimas MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP são mais comumente identificadas em câncer de cabeça e pescoço e associadas com a progressão da doença (Werner et al., 2002; Rosenthal & Matrisian, 2006).

Estudos recentes têm mostrado que MMP-2 e MMP-9, pertencentes à subfamília das gelatinases, têm função de digestão do colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal, e tem sido evidenciado que expressão aumentada de gelatinases tem significativa correlação com estágio, metástase em linfonodos e prognóstico reservado em câncer de cabeça e pescoço, principalmente em câncer oral e de laringe (Sâmara et al., 2004; Liu et al., 2005). A MT1-MMP, pertencente a família das MMP tipo membrana, além de degradar colágeno tipo I e outros componentes da matriz, também ativa MMP-2. Dessa forma é considerada uma enzima crítica no controle da atividade proteolítica. O

carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço foi um dos primeiros tumores nos quais a enzima MT1-MMP foi identificada (Rosenthal & Matrisian, 2006).

As MMPs podem ser inativadas por inibidores de MMPs de ocorrência natural (TIMPs). No entanto, as TIMPs também apresentam outras funções biológicas, por exemplo, TIMP-2 é necessária para a ativação de pro-MMP-2 (Itoh et al., 2001). Dessa forma, a superexpressão de TIMPs também têm sido associadas com prognóstico reservado em pacientes com HNSCC (Culhaci et al., 2004).

Embora estudos têm indicado que a inibição das MMPs, *in vitro* e em modelos animais, diminui invasão e metástase de células tumorais, as triagens clínicas para inibidores de MMPs têm falhado em demonstrar uma significativa vantagem de sobrevida em seres humanos (Douillard et al., 2004). A discrepância entre esses estudos tem levado a uma reavaliação da atuação das MMPs no desenvolvimento do câncer e no desenho de novos alvos terapêuticos. Outro ponto a ser considerado é quanto a complexidade da regulação pós-traducional das MMPs, como esta família de enzimas requer processamento para a sua ativação, a análise de expressão gênica ou protéica não prediz completamente sua atividade catalítica (Rosenthal & Matrisian, 2006).

Outras proteases também têm demonstrado desempenhar um papel no desenvolvimento de HNSCC. O ativador de plasminogênio tipo uroquinase (PLAU) tem participação tanto no processo de angiogênese como no processo de invasão das células tumorais (Speleman et al., 2006). Essa enzima ao se ligar ao seu receptor celular, u-PAR, promove a conversão do plasminogênio em plasmina. A plasmina gerada estimula a migração das células endoteliais e a quebra da membrana basal, além disso, atua na ativação de outras proteases como elastases e MMPs. Dessa forma, há interações recíprocas entre a enzimas PLAU e MMPs que levam a degradação da matriz extracelular (Mahanivong et al., 2007). Estudos têm evidenciado que *PLAU* e seu receptor, *u-PAR* encontram-se superexpressos em HNSCC (Schmidt et al., 2000; Pacheco, 2002; Wojtukiewicz et al., 2003).

Genes de suscetibilidade

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo combinado de álcool e fumo constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (Scully et al 2000a). Embora muitos indivíduos estejam expostos a estes fatores de risco, somente uma parcela desenvolve câncer, sugerindo que diferenças genéticas individuais influenciam a carcinogênese. (Hashibe et al., 2003; Petters et al., 2006).

A maioria dos agentes mutagênicos e carcinogênicos requerem ativação metabólica para exercerem seus efeitos genotóxicos. Várias enzimas metabólicas estão envolvidas na ativação e destoxificação de compostos carcinogênicos ou pró-carcinogênicos, incluindo enzimas de Fase I, como álcool desidrogenase e citocromo P450, e de Fase II, como as glutatona S-transferases e N-acetil-transferases. Contudo, essas enzimas são polimórficas na população e a variação individual na metabolização dos carcinógenos e pró-carcinógenos tem sido relacionada com a suscetibilidade diferencial ao câncer (Bonassi & Au, 2002).

O gene *CYP1A1*, membro da família do Citocromo P450, está envolvido na ativação de vários pró-carcinógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), os quais estão presentes na fumaça do cigarro e em certos alimentos (Pavanello & Clonfero, 2000). A expressão de *CYP1A1* é induzida por PAH, e o produto gênico é responsável pelo primeiro passo de ativação de PAH. Polimorfismos de *CYP1A1*, que conferem aumento de sua atividade catalítica, já foram associados com maior suscetibilidade para neoplasias de pulmão, mama, próstata e de cabeça e pescoço (Kao et al., 2002; Marchand et al., 2004; Gajecka et al., 2005).

A *CYP2E1*, enzima de Fase I, está envolvida no metabolismo do etanol e acetona, além de catalizar a oxidação e formação de adutos a partir de vários compostos presentes na fumaça do cigarro, tais como nitrosaminas e benzeno. Polimorfismos na região promotora do gene *CYP2E1* identificados por enzimas de restrição, como *PstI* e *RsaI*, são correlacionados com aumento da atividade transcricional do gene e conseqüentemente

suscetibilidade aumentada para várias neoplasias, entre elas câncer de cabeça e pescoço (Bouchard et al., 2000; Gattás et al., 2006).

No entanto, outros estudos não apóiam a associação entre polimorfismos de *CYP1A1* e *CYP2E1* com risco aumentado de desenvolvimento de HNSCC (Neuhaus et al., 2004; Davascena et al., 2007).

Entre as enzimas de fase II destacam-se as Glutathionas-S-transferases, as quais constituem uma família de enzimas citosólicas ou microsossomais, que catalizam numerosas reações de redução dependente da glutathiona, gerando produtos extremamente hidrofílicos, que são facilmente excretados da célula. O gene *GSTM1*, pertencente à família μ e localizado em 1p13.3, é responsável pela conjugação da glutathiona a epóxidos derivados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e o gene *GSTT1*, pertencente a família θ e localizado em 22q11.2, é responsável pela destoxificação de monohalometanos, diclometanos e óxido de etileno (Pavanelo & Clonfero, 2000). Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são altamente polimórficos entre as etnias e vários estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos homozigotos nulos para *GSTM1* e/ou *GSTT1* têm um risco aumentado para vários tipos de neoplasias (Habdous et al., 2004). Vários autores demonstraram uma associação do genótipo *GSTM1* nulo e HNSCC (Gajecka et al., 2005; Gattás et al., 2006; Petters et al., 2006; Capoluongo et al., 2007; Davascena et al., 2007), enquanto outros não (To-Figueras et al., 2002; Ophuis et al., 2006). Para o genótipo *GSTT1* nulo também foi demonstrada uma relação em alguns casos (Hashibe et al., 2003; Evans et al., 2004; Oude et al., 2006) e ausência em outros (To-Figueras et al., 2002; Gattás et al., 2006; Capoluongo et al., 2007).

As associações entre polimorfismos das enzimas que atuam na metabolização de xenobióticos e câncer de cabeça e pescoço não têm sido homogêneas, possivelmente devido á etnia, estilo de vida ou fatores ambientais das populações estudadas, bem como a necessidade de avaliação simultânea de um maior número de enzimas metabolizadoras (Gattás et al., 2006).

Os dados apresentados acima ilustram alguns dos inúmeros aspectos das bases bioquímicas do câncer, cuja compreensão, entretanto, está longe de ser completamente atingida. As numerosas lesões genéticas acumuladas no clone neoplásico são provavelmente responsáveis pela heterogeneidade clínica das neoplasias, a variação na resposta terapêutica, evolução e alguns de seus comportamentos. Além disso, a mudança do tecido normal a neoplásico é acompanhada por mudanças na expressão de um número variável de genes, refletindo na mudança do RNAm correspondente, assim como na eventual presença de transcritos de RNAm anormais. A identificação de expressão gênica diferencial entre tecido normal e maligno é fundamental para a compreensão do processo carcinogênico (Al Moustafa et al., 2002). Entre as técnicas que avaliam a expressão gênica em tecidos neoplásicos, podemos destacar a técnica de *microarray*, a qual será descrita a seguir.

B. A tecnologia de *microarray* no estudo do câncer de cabeça e pescoço

O fenótipo neoplásico é definido pelo acúmulo de mutações e mudanças epigenéticas que podem alterar a função protéica e/ou causar alterações nos programas transcricionais. Estes efeitos conferem vantagens competitivas para a célula, levando ao fenótipo maligno. Dessa forma, a análise global transcricional é uma importante ferramenta para revelar alguns destes mecanismos moleculares que levam a malignidade (Reis et al., 2005).

Duas tecnologias de análise global da expressão gênica têm gerado um grande impacto em nossa habilidade para estabelecer uma visão global dos processos celulares: análise seriada da expressão gênica (SAGE) e *microarray*.

O desenvolvimento do chamado chip de DNA ou tecnologia de *microarray* permite investigar os níveis de expressão de centenas ou milhares de genes em uma dada amostra usando uma reação de hibridização. Um *array* pode ser definido como uma coleção

ordenada de sondas, cada sonda representando uma única espécie de ácido nucléico e correspondendo ao gene de interesse. A tecnologia é baseada na hibridização entre seqüências de cDNA alvos, derivadas das amostras de interesse que são marcadas com fluoróforos ou radioisótopos, com um *array* de várias sondas de DNA, que estão imobilizadas em uma matriz sólida.. Essa matriz pode ser uma lâmina de vidro ou sílica ou uma membrana de nylon. Quanto aos fluorocromos os mais utilizados são Cy3 (Cyanine 3) e Cy5 (Cyanine 5), os quais apresentam características distintas de fluorescência, o que permite que duas amostras diferentes possam ser co-hibridizadas na matriz sólida. O sinal de hibridização produzido em cada sonda corresponde ao nível de expressão do respectivo gene em determinada amostra no momento do estudo. Dessa forma, após a hibridização competitiva dos alvos marcados, os sinais são detectados, quantificados, integrados e normalizados com *softwares* específicos e refletem o perfil de expressão gênica para cada amostra biológica (Rijn & Gilks, 2004) (Figura 1).

As plataformas de *array* podem ser divididas em dois grandes grupos, aqueles que usam oligonucleotídeos sintéticos e aqueles que usam fragmentos de cDNA. A primeira pode ser obtida tanto por síntese *in situ* de oligos relativamente pequenos, uma metodologia conhecida como fotolitografia ou por deposição robótica de oligos maiores, variando de 50 a 80 nucleotídeos. Em *microarrays* de cDNA, os fragmentos podem ser obtidos por PCR ou por técnicas de clonagem, os quais podem ser arranjados em superfície de vidro ou nylon também com o auxílio de um braço robótico (Marshall et al., 2004; Brentani et al., 2005).

Atualmente, na pesquisa oncológica, abordagens baseadas em microarray têm sido usadas imensamente para diversas propostas. Uma de suas principais aplicações é a identificação de clusters de genes associados com o desenvolvimento de um tipo de câncer em particular. Diferentes estudos no perfil de expressão de genes em amostras tumorais têm revelado a grande heterogeneidade transcricional do câncer e têm permitido a classificação de novas subclasses clínicas e biológicas importantes da doença (Kallioniemi et al., 2001; Perez-Diez et al., 2007).

Experimentos de Microarray

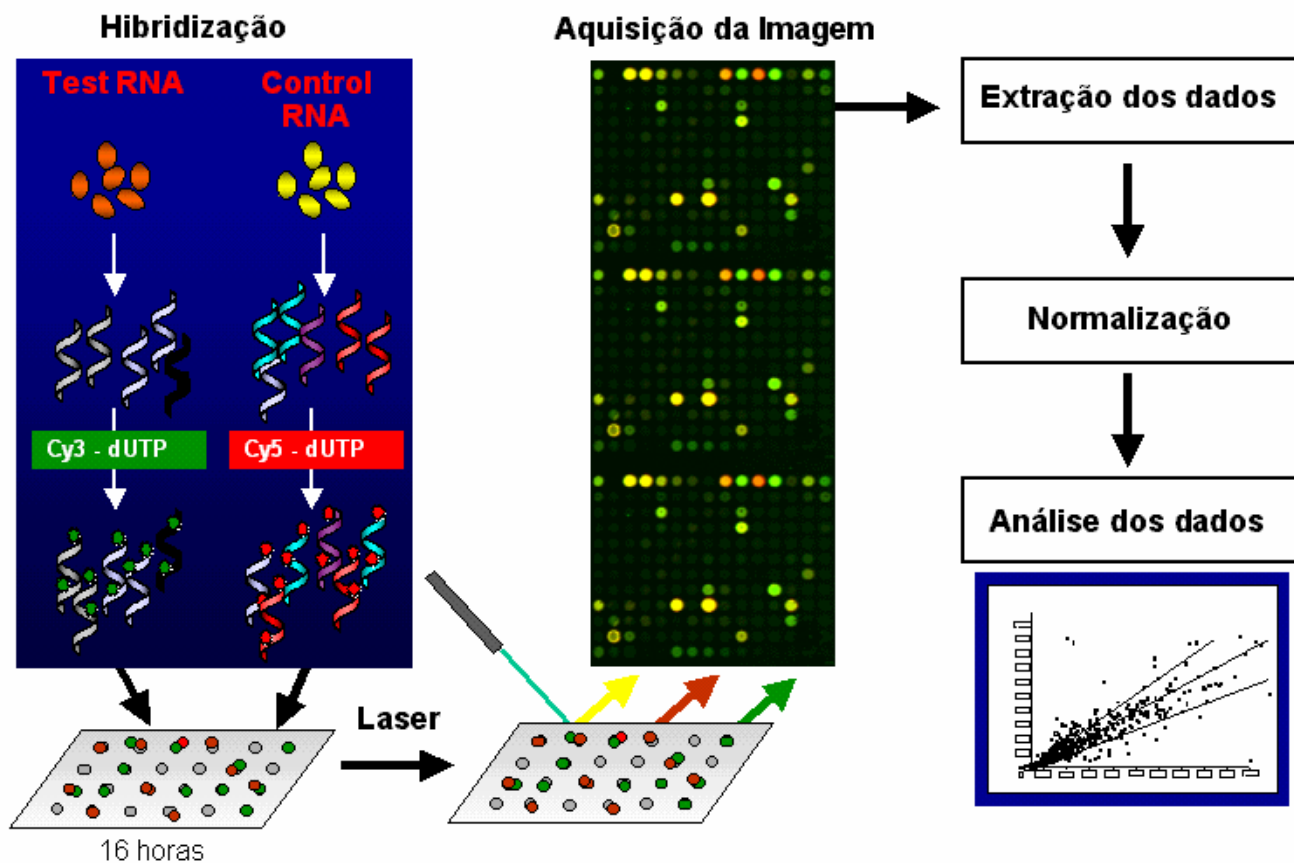


Figura 1. Esquema de hibridização e análise dos dados de microarray. A tecnologia de *microarray* é baseada na hibridização entre alvos livres marcados derivados de amostras biológicas e um *array* de muitas sondas de DNA imobilizadas em uma matriz sólida. Os alvos são produzidos a partir de RNA de amostras biológicas por transcrição reversa, marcados com fluoróforos específicos (Cy3 e Cy5) e co-hibridizados com as sondas de DNA por 16 horas. Os sinais resultantes da hibridização são excitados por um feixe de laser, para a aquisição de imagem. Posteriormente, os sinais são quantificados, integrados e normalizados com *softwares* específicos, e refletem o perfil de expressão para cada amostra biológica.

Dessa forma, as vantagens dessa técnica têm sido demonstradas em estudos realizados em uma extensa variedade de neoplasias, incluindo câncer de pulmão, estômago, próstata, mama, ovário, fígado, pâncreas, bem como câncer de cabeça e pescoço (Beer et al., 2002; Meireles et al., 2004; Reis et al., 2004; Jansen et al., 2005; Lancaster et al., 2006; Lemmer et al., 2006; Nakamura et al., 2007).

Em 1998, Chang et al. reportaram pela primeira vez a aplicação da técnica de microarray na identificação de genes que sofrem alterações durante o desenvolvimento de câncer oral, o qual pertence ao grupo de câncer de cabeça e pescoço.

Posteriormente, vários outros trabalhos também estudaram o perfil de expressão gênica em tumores de cabeça e pescoço, os quais encontraram alterações na expressão de genes envolvidos em diversos mecanismos celulares como controle do crescimento e diferenciação celular, angiogênese, apoptose, adesão e motilidade celular, remodelação tecidual, ciclo celular, sinalização, regulação da transcrição e sistema imune (Alevizos et al., 2001; Al- Moustafa et al., 2002; Belbin et al., 2002; Chen et al., 2003a; Gonzalez et al, 2003; Há et al., 2003; Chung et al, 2004; Jeon et al., 2004; Kuriakose et al., 2004; Sotiriou et al., 2004; Belbin et al., 2005; Chin et al., 2005; Roepman et al., 2005; Dysvik et al., 2006; Kainuma et al., 2006; Tomioka et al., 2006)

A maioria dos estudos, a princípio, descreveu as mudanças globais na transcrição de genes que diferenciavam epitélio escamoso normal de carcinoma. Dessa forma, em 2001, Alevizos et al. analisaram a expressão diferencial em tecido tumoral e normal de câncer de cabeça e pescoço, usando um *array* com sondas para 7.000 genes. Esses autores encontraram 600 genes associados com o desenvolvimento de câncer oral, incluindo oncogenes, genes supressores de tumor, fatores transcricionais, enzimas metabolizadoras de xenobióticos e proteínas associadas à metástase. Sok et al. (2003) também compararam o perfil de expressão em 9 amostras normais e tumorais de cabeça e pescoço utilizando um

array de 12.000 genes, encontrando 227 genes diferencialmente expressos referentes a genes supressores de tumor, quimiocinas, receptores de membrana e fatores de transcrição. Os autores destacaram o gene do colágeno tipo XI alpha 1, o qual estava expresso em todos os tumores e não foi detectado em tecido normal.

Al Moustafa et al. (2002), no entanto, compararam o perfil de expressão, por *microarray*, entre linhagens celulares de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e linhagens celulares normais, provenientes do mesmo paciente e validaram os resultados por PCR em tempo real. Os autores observaram mudanças na expressão de 213 genes, com 91 genes superexpressos e 122 com baixa expressão no tecido tumoral, verificando que a maioria dos genes que estavam superexpressos em células neoplásicas codificavam fatores de crescimento e estruturas celulares, enquanto que aqueles pouco expressos estavam envolvidos na adesão celular, motilidade, apoptose e metabolismo. Jeon et al. (2004) também estudaram o perfil de expressão gênica em linhagem celular de câncer de cabeça e pescoço e verificaram que genes envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose e adesão celular estavam alterados nas linhagens celulares. Os genes que apresentavam alta expressão incluíam oncogenes conhecidos, reguladores do ciclo celular, genes codificadores de proteínas quinases e de proteínas ligantes de DNA; e os genes que apresentavam baixa expressão incluíam genes codificadores de proteínas de adesão celular, proteínas de matriz extra-celular, proteínas estruturais e inibidoras de protease.

González et al. (2003), por sua vez, estudaram a expressão gênica em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, como também em linhagens celulares. As diferenças encontradas *in vivo* foram testadas *in vitro* pela comparação com cultura de células normais e linhagem celular derivada de HNSCC. Os resultados foram validados por PCR e imuno-histoquímica, destacando-se 9 genes, os quais mostraram marcante diferença de expressão entre os tecidos normais e tumorais: *CAGB*, *CD24*, *LEKT1*, *ZNF-185*, *TGM3*, *EHF*,

headpin, *periostin* e *ABCG1* Os genes. *LEKT1*, *ZNF-185*, *TGM3*, *headpin* e *ABCG1*, mostraram um perfil de expressão similar tanto nas linhagens quanto nas amostras.

As diferenças no perfil de expressão entre amostras de tecido tumoral e normal de cabeça e pescoço também foram investigadas recentemente por estudos realizados por Somoza–Martín et al. (2005), Kainuma et al (2006) e Tomioka et al. (2006). No estudo realizado por Kainuma et al. (2006), os autores destacaram a superexpressão nos genes para metaloproteinases de matriz-1, 3 e 10, interleucina-8, caderina 3, bem como a baixa expressão nos genes para queratina 4 e 13. Tomioka et al. (2006) utilizaram uma plataforma de 16.617 genes para analisar a expressão gênica diferencial em 9 amostras de carcinoma oral. Os autores observaram expressão alterada em 47 genes, envolvidos em adesão celular, apoptose, ciclo celular, crescimento, metabolismo, transcrição e tradução de sinal.

Recentemente, também, Dysvik et al (2006) analisaram as diferenças no perfil de expressão gênica entre tecido tumoral e normal de cabeça e pescoço em duas populações distintas, uma sudanesa e outra norueguesa. O estudo se mostrou muito interessante, pois a análise das duas populações revelou um conjunto comum de 73 genes diferencialmente expressos, indicando que o desenvolvimento de HNSCC é mediado por um programa biológico similar, apesar das diferenças relacionadas com etnia e exposição a fatores ambientais e carcinógenos.

Um modelo de progressão de lesões em tecido de cabeça e pescoço foi proposto por Ha et al (2003). Nesse estudo, os autores observaram que a maioria das alterações transcricionais foi encontrada antes do desenvolvimento do fenótipo maligno. A progressão de tecido normal a pré-maligno foi associada com expressão alterada de 334 genes, enquanto a progressão de pré-maligno a maligno foi associada com expressão alterada de 23 genes. As funções dos genes que estavam com alta expressão nas lesões malignas quando comparadas com mucosa normal foram principalmente associadas com angiogênese, apoptose, adesão celular, ciclo celular, modulação de citocinas, regulação da transcrição e

vias de sinalização celular. Dessa forma, de acordo com Ha et al. (2003) lesões pré-malignas de cabeça e pescoço possuem muitas das alterações encontradas em câncer antes do desenvolvimento de um fenótipo maligno, pois a maioria das alterações ocorre antes da expressão fenotípica da malignidade. Estudos realizados por Serewko et al. (2002), por sua vez, indicam que alterações em genes associados com matriz extra-celular e apoptose são alterados em fases iniciais da neoplasia, enquanto estágios posteriores estão associados com alterações em genes de reparo de DNA ou de fatores de crescimento

Outros estudos sugerem que subtipos histológicos distintos exibem diferentes assinaturas de expressão gênica. Um estudo realizado por El-Naggar et al. (2002) comparou seis amostras de HNSCC com histologia convencional com seis subtipos histológicos menos comuns, conseguindo distingui-los pelo perfil de expressão gênica.

Análise de *microarray* também tem sido usada para identificar assinaturas de expressão gênica distintas associadas com evolução clínica. Dessa forma, Belbin et al. (2002), usando uma plataforma com 9216 clones, identificaram 375 genes diferencialmente expressos em HNSCC, os quais dividiam os pacientes estudados em dois subgrupos clinicamente distintos. Estes resultados demonstraram que o perfil de expressão pode ser usado como um preditor de evolução clínica.

Do mesmo modo, Chung et al. (2004) identificaram 4 distintos subtipos de HNSCC com diferentes evoluções clínicas baseados nos modelos de expressão obtidos de 60 amostras de HNSCC que exibiam diferenças significativas quanto ao índice de sobrevivência livre de recorrência. Esse estudo, bem como os trabalhos de Villaret et al. (2000), Hartmann et al. (2002), Nagata et al. (2003) e Kainuma et al (2006) evidenciaram superexpressão de metaloproteinases de matriz, como *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9* em HNSCC, reforçando o seu papel no desenvolvimento desse tipo de neoplasia.

Ginos et al. (2004) encontraram uma assinatura de expressão, relacionada com genes envolvidos em invasão tumoral e metástase, em pacientes com HNSCC que

apresentavam recorrência local. Os tumores estudados também apresentavam ausência de uma assinatura gênica relacionada com resposta imune, sugerindo que a modulação da resposta imune específica do tumor pode ter um papel na falha do tratamento. Em outro estudo, Bebin et al. (2005) avaliaram os perfis de expressão de progressão tumoral em 9 pacientes com estágio III e IV e identificaram 140 genes cuja expressão aumentou e 94 genes cuja expressão diminuiu durante a progressão de normal a tumor invasivo e desse a metastático. Esse estudo avaliou tumores em estágio avançado e mostrou um modelo distinto de expressão, evidenciando alta expressão do gene que codifica a proteína moesina, a qual está envolvida na regulação da adesão celular, e baixa expressão de quatro potenciais genes supressores de tumor.

Chin et al.(2005), por sua vez, estudando o perfil de expressão de 13.000 genes em 7 casos de câncer de cabeça e pescoço identificaram 1.260 genes diferencialmente expressos, destacando o gene da osteonectina como um marcador de prognóstico independente para intervalo livre de doença e sobrevivência global reduzidos. Também foi observada superexpressão dos genes *PAI-I* e *PLAU* , os quais estão envolvidos em indução angiogênese e metástase.

Estes estudos reforçam o papel da análise da expressão gênica como um instrumento preditor de evolução em HNSCC. Além disso, o perfil molecular de tumores primários de HNSCC também foi recentemente investigado para verificar o seu potencial de prever o desenvolvimento de metástase em linfonodo no momento do diagnóstico. Dessa forma, Nagata et al. (2003) estudaram o perfil de expressão de 57 genes previamente relacionados com câncer em 15 pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, encontrando 7 genes, *MMP-1*, *MMP-3*, *PLAU*, *integrina-alfa 3*, *paxilina*, *tenascina C* e *IL-6*, superexpressos em tumores metastáticos.

Em estudo realizado por Roepman et al. (2005) observou-se um conjunto preditor de metástase composto por 102 genes, o qual foi baseado no perfil de expressão de

82 amostras de HNSCC de cavidade oral e orofaringe, sendo 45 metastáticas e 37 não metastáticas. Quando o conjunto preditor foi utilizado para clusterizar 22 amostras independentes, o *status* de metástase em linfonos foi corretamente predito em 86,4% dos casos. Em estudo anterior, Irié et al (2004) utilizaram microdissecção a laser para estudar o perfil de expressão gênica em carcinoma oral. Os autores encontraram um conjunto de genes diferencialmente expressos em comum entre os casos que eram positivos para metástase com os casos que eram negativos.

Roepman et al (2006) também observaram que o perfil de expressão gênica em tumores primários de HNSCC é mantido nos tumores metastáticos cervicais, dessa forma, o perfil de expressão gênica em tumores primários tem um papel importante na sobrevivência e proliferação das células que metastizam para os linfonodos cervicais. De acordo com os autores uma vez que o tumor primário adquiriu fenótipo metastático, poucas alterações futuras na expressão gênica são necessárias para que as células tumorais estabeleçam metástase em linfonodos cervicais e posteriormente metástase a distância. Esses achados também estão de acordo com estudo realizado por O'Donnel et al. (2005). No entanto, Braakhuis et al. (2006), não encontraram uma assinatura de expressão gênica que pudesse prever metástase em HNSCC.

Dessa forma, embora haja ainda controvérsia, a maioria dos estudos sugere que o tumor primário possui uma assinatura que prediz seu potencial metastático. Tal fato é extremamente relevante, uma vez que a acurácia para prever o potencial metastático de tumores de cabeça e pescoço primários poderá guiar apropriadamente uma terapia mais agressiva nos casos necessários, bem como para evitá-la nos casos em que os pacientes apresentarem baixo risco de metástase. (Chung et al., 2006; Roepman et al., 2006).

Como pode ser observado, há grande heterogeneidade entre estes estudos em termos de delineamento experimental, número de amostras, sítios e estágios da doença, escolha da plataforma de *array* e validação dos resultados por diferentes metodologias.

C. Busca por biomarcadores moleculares em câncer de laringe

O Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer-SP, juntamente com a FAPESP, lançaram há oito anos 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. Foram catalogadas 1.187.324 seqüências, das quais, 143.414 são de tumores cerebrais, 160.565 de mama, 169.849 de cólon, 12.367 de rim e 213.636 de tumores de cabeça e pescoço e tireóide. Essas últimas compreendem o maior conjunto de ESTs desses tumores já depositadas em bancos de dados, superando em cerca de 34,4 vezes o número de seqüências geradas pelo *Cancer Genome Anatomy Project* (CGAP) do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos.

Devido ao grande número de seqüências de cabeça e pescoço obtidas e pela disponibilidade de acesso às informações clínicas detalhadas, derivou-se do referido Projeto, o Head and Neck Annotation Consortium, que teve como objetivo avaliar detalhadamente esse conjunto de dados, extraíndo informações significativas sobre o processo de tumorigênese de cabeça e pescoço.

Os dados desse projeto mostraram-se muito relevantes e foram publicados em 2005 na revista científica *Cancer Research*, cujo título do artigo é “Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck, and thyroid cancer” (Reis et al., 2005).

Dessas 213.636 seqüências gênicas de cabeça e pescoço e tireóide obtidas pelo Projeto Genoma Humano do Câncer, após filtragem de contaminantes, a análise das remanescentes 173.640 ESTs (81%) resultou em 32.576 contigs e 24.434 singlets. Todas as seqüências mapeadas que exibiam sobreposição genômica foram incluídas no mesmo cluster genômico, dessa forma, reduzindo o conjunto de dados para uma coleção não redundante de 48.001 seqüências agrupadas em 20.384 clusters genômicos. Isto correspondia a 38% do total

de grupos genômicos formados por todas as ORESTES e incluíam um numero de clusters que eram exclusivos de tecido de cabeça e pescoço (2.712) ou tireóide (1.331).

Do total de 20.348 clusters genômicos que continham seqüências de cabeça e pescoço e tireóide, uma significativa fração, ou seja, 5.038 clusters (25%) representam possíveis novos transcritos humanos, pois não tinham similaridades significativas com genes humanos previamente conhecidos. No entanto, 507 tinham indicação de alto potencial codificante. Entre esses, 254 mapeavam em regiões intrônicas de RefSeq gênicas e podiam representar novos exons e os 253 remanescentes mapeavam em regiões intergênicas e podiam representar fragmentos de novos genes humanos.

A maioria dos novos transcritos de cabeça e pescoço e tireóide mapeavam em regiões genômicas previamente associadas a câncer de cabeça e pescoço e tireóide. Foram encontrados 12 prováveis novos transcritos que mapeavam em 22q11-12, região envolvida na carcinogênese de laringe.

Um total de 788 eventos de new splicing foram identificados em 748 diferentes transcritos. A maioria dos new splicing foi devido a eventos de inserção.

O trabalho também identificou um conjunto de 8.988 clusters genômicos exclusivos de tecido não tumoral de cabeça e pescoço ou tireóide. Esse conjunto provavelmente está enriquecido em genes que apresentam baixa expressão durante o desenvolvimento e progressão tumoral. Esse conjunto continha seqüências que mapeavam em regiões freqüentemente deletadas em câncer de cabeça e pescoço. Estas observações sugerem fortemente que uma desconhecida atividade supressora tumoral em câncer de cabeça e pescoço e tireóide possa ser encontrada dentro desse conjunto de dados selecionados de candidatos à perda de heterozigidade.

Também foram encontrados 3.776 clusters exclusivamente derivados de tecido tumoral de cabeça e pescoço e tireóide, dos quais 144 mapeiam em regiões previamente descritas como freqüentemente amplificadas em câncer de cabeça e pescoço. Desses, 12 eram

transcritos de oncogenes conhecidos, enquanto um outro conjunto formado por 30% desses clusters eram de genes com função desconhecida.

O presente projeto fez parte da proposta apresentada pelo Head and Neck Annotation Consortium, e teve por objetivo a identificação e a validação de genes diferencialmente expressos em tecido tumoral e normal de laringe, a partir de clusters identificados pelo grupo.

Os tumores de laringe foram escolhidos por estarem entre os de maior incidência no Estado de São Paulo, além disso, apesar das novas estratégias terapêuticas, permanecem como um dos mais frequentes e desfigurantes tumores que afetam tanto a duração como a qualidade de vida. A determinação da expressão gênica do tumor pode significar a identificação de biomarcadores para prognóstico e diagnóstico precoce de tumores de laringe, resultando em novas patentes e em abordagens clínicas e terapêuticas mais adequadas.

Durante este trabalho, foi realizado o levantamento de dados e seleção dos clusters identificados pelo Head and Neck Annotation Consortium, que seriam analisados no presente projeto. O critério para seleção dos genes foi baseado em sua localização cromossômica, pois foram selecionados genes que mapeavam em regiões cromossômicas de perda ou ganho envolvidas na tumorigênese de cabeça e pescoço. O estabelecimento dessas regiões de perda ou ganho foi realizado de acordo com o trabalho de Knuutila et al. (2000).

No total, foram selecionados 139 genes, dos quais 99 mapeavam em região de perda cromossômica envolvida na carcinogênese de cabeça e pescoço e 40 mapeavam em região de ganho. Dessa forma, com a análise de expressão desses dois conjuntos, poderiam ser encontrados genes com função supressora tumoral ou oncogênica, respectivamente.

A classificação funcional dos genes espotados no cDNA *microarray* foi realizada segundo consulta no *site* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Dessa forma, observou-se

que os genes selecionados estavam envolvidos em processos como adesão celular, apoptose, ciclo celular, metabolismo, motilidade celular, proliferação celular, proteólise, regulação da transcrição, reparo de DNA, resposta imune, sinalização celular, transporte e transdução de sinal.

No Anexo I encontra-se uma tabela com a descrição dos genes que foram amplificados para a construção do cDNA *microarray*.

Com o objetivo de aumentar o número de genes que seriam analisados no *array*, foram também utilizados no presente trabalho, 201 clones gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer da FAPESP e selecionados pelo grupo *Head and Neck Annotation Consortium*. Estes clones estavam sob responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Almeida-Verjovski. e Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, do Instituto de Química da USP. Destes 201 clones, 149 *clusters* genômicos eram candidatos a LOH (*Loss of Heterozygosity*) e 52 eram referentes a transcritos que não tinham similaridade com genes conhecidos. Esses clones também foram utilizados para a construção do cDNA *microarray*.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram identificar possíveis biomarcadores moleculares envolvidos na carcinogênese de laringe, por meio da seleção de *clusters* identificados pelo *Head and Neck Annotation Consortium*, e a partir dessa seleção comparar sua expressão diferencial em tecido neoplásico e normal de laringe, por meio de *microarray* e validação por RT-PCR em tempo real.

Seus objetivos específicos compreenderam:

- 1) confeccionar um cDNA *microarray* a partir dos *clusters* identificados pelo *Head and Neck Annotation Consortium*, que mapeavam em regiões de perda ou ganho envolvidas na carcinogênese de cabeça e pescoço;
- 2) comparar o perfil de expressão desses genes em tecido neoplásico e normal de laringe;
- 3) selecionar genes candidatos, que tenham sido diferencialmente expressos em tecido neoplásico e normal;
- 4) validar a expressão diferencial desses genes candidatos por PCR em tempo real (PCR quantitativa) em tecido normal e neoplásico de laringe;

II – ARTIGO ORIGINAL:

***Differential gene expression profiling of laryngeal
squamous cell carcinoma by microarray analysis***

Para submissão ao periódico *International Journal of Cancer* (ISSN 0020-7136)

Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by microarray analysis

Jucimara Colombo¹, Ângela A. Fachel², Marília de Freitas Calmon¹, Patrícia Maluf Cury³, Érica Erina Fukuyama⁴, Eloiza Helena Tajara³, José Antônio Cordeiro⁵, Sergio Verjovski-Almeida², Eduardo M. Reis², Paula Rahal¹

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brazil

²USP – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, SP, Brazil

³FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia Molecular, São José do Rio Preto, SP, Brazil

⁴Hospital do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo, SP, Brazil

⁵FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Note: Eduardo M. Reis and Paula Rahal supervised equally this work

Running title: Differential gene expression profiling of larynx cancer

Corresponding author: Eduardo M. Reis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Tel.: +55-11-30913810; fax: +55-11-30912186

E-mail address: emreis@iq.usp.br

Abstract

Laryngeal squamous cell carcinoma is very common in head and neck cancer, accounting to 25% of cases, with high mortality rates and poor prognosis. The development of head and neck cancer is a multistep process frequently accompanied by genetic and epigenetic changes. In recent years, the molecular basis of head and neck cancer started to be investigated using expression DNA microarrays. These studies have identified different sets of genes whose expression levels can be correlated to the neoplastic phenotype of head and neck tumors, or with the evolution and clinical outcome of the disease. Most gene expression profiling studies of head and neck cancer have been performed with tumor samples from distinct head and neck topologies. In this study, we analyzed a homogeneous set of clinical samples of larynx carcinoma to minimize the genetic differences. Total RNA of 15 larynx tumor samples and 10 normal samples were used for hybridization with a home-build cDNA microarray containing 340 probes for genes previously identified as up or down-regulated in head and neck tumors by the Head and Neck Annotation Consortium. Thirty five genes showed statistically significant differences ($\text{SNR} \geq |1.0|$, $p\text{-value} \leq 0.001$) in expression between tumor and non-tumor larynx tissue samples, and are involved in cellular processes relevant to the cancer phenotype, such as apoptosis, cell cycle, DNA repair, proteolysis, protease inhibition, signal transduction and transcription regulation. Differential expression of 10 of these genes (*ADCY6*, *AES*, *AL2SCR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* and *ZNF706*) was independently confirmed by quantitative real time RT-PCR. Among these, the *CSTB* gene product has cysteine protease inhibitor activity that can be associated to an anti-metastatic function. Interestingly, *CSTB* showed low expression in all tumor samples analyzed. ($p\text{-value} = 0.000$). The set of genes identified here will contribute to the comprehension of the molecular basis of larynx cancer, and at the same time provide novel candidate markers for to improve diagnosis, prognosis and treatment of this carcinoma

Keywords: cDNA microarray, head and neck cancer, larynx carcinoma, gene expression, biomarkers, real time RT-PCR, *CSTB*

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common cancer world-wide with a global yearly incidence of 780,000 new cases.¹ More than 90% of this cancer type has a squamous origin and common sites include hypopharynx, larynx, oral cavity, nasopharynx, oropharynx, paranasal sinus, nasal cavity, parathyroid and salivary glands.^{2,3} Laryngeal squamous cell carcinoma is very common in head and neck cancer, accounting to 25% of cases, and 2% of all cancers, approximately.⁴

Tobacco use and/or alcohol consumption are the two principal risk factors involved in development of HNSCC. Other factors include poor oral hygiene, nutritional deficiencies and some viruses, such as, human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus.^{2,5,6}

Despite recent advances in treatment, the long-term survival rate of head and neck squamous cell carcinoma patients has remained at 50% with high rates of associated mortality.⁵ Late presentation of lesion, lack of suitable markers for early detection and failure of advanced lesions to respond to available chemotherapy contribute to a poor outcome of HNSCC.⁷ However, loco-regional relapse and metastasis after conventional therapy appear to be the major contributing factors for restricted survival of the HNSCC patients.¹

Many clinical and pathological prognostic factors have been described in HNSCC (tumor stage, lymph node involvement, postsurgical margin, and histological grade). Nevertheless, as prognostic biomarkers, clinical or pathological factors lack sensitivity and accuracy in the clinical setting and with the exception of disease stage, are frequently not used to guide treatment decisions.⁸ The TNM (tumor/node/metastasis) staging system that is most often used to classify patients with HNSCC is based on the clinical, radiologic and pathologic examination of tumor specimens.^{9,10} However, this system does not adequately address the molecular heterogeneity of HNSCC.¹⁰ Thus, factors deciding on its clinical characteristics including carcinogenesis, development, progression, angiogenesis, invasion and metastasis have not been elucidated yet.¹¹

The development of HNSCC is a multistep process accompanied by genetic and epigenetic changes, including loss of heterozygosity, gene inactivation by methylation and gene amplification, all of which can alter gene expression.¹² Different studies revealed numerous molecular abnormalities in HNSCC, including activation of oncogenes such as *CCND1(PRADI)*,¹³ *EGFR*,¹⁴ *RAS*,¹⁵ and *C-MYC*;¹⁶ tumor suppressor gene inactivation such as *CDKN2A (p16)*,¹⁷ *TP53*,¹⁸ *p27*,¹⁹ and *WAF1/CIP1*;²⁰ expression of angiogenic factors and loss of heterozygosity at numerous chromosomal locations.^{21,22} For instance, the most frequent cytogenetic alterations in HNSCC are gains of 3q, 8q, 20q, 7q, 11q13 and 5p and losses in 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q and 8p.²³ In the loci, there are genes that encode specific functional classes of proteins such as cell cycle regulators, tumors suppressors, cell adhesion and protein kinases.²⁴

The development of cDNA microarray technology and bioinformatics allows analysis of the expression of thousands of genes simultaneously and thus provides a unique opportunity to identify molecules differentially expressed in tumor and normal tissues.²⁵

In recent years, large-scale studies involving microarrays have identified specific gene expression signatures associated with expressions changes in HNSCC tissue samples compared to normal tissue, as well and genes involved with clinical outcomes and metastasis.^{8,9,11,23,26-40} However, most microarray studies are performed using tumors from different sites in head and neck. In our study, by analyzing only larynx carcinoma samples, we sought to minimize the genetic differences that may be present in anatomically diverse tumors of the head and neck region, thus favoring the identification of genes specifically associated with tumors with the same histological origin.

The identification of genes involved in carcinogenesis of larynx may provide key factors to the understanding of these tumors and might lead to the development of diagnostic markers and/or effective therapeutic strategies. Thus, comprehensive and exhaustive

expression studies of the great number of genes, including functionally unknown genes, are essential to understanding the complexity of larynx carcinoma.

In the present study, we used a cDNA microarray platform containing 340 sequences previously identified by Head and Neck Annotation Consortium⁴¹ to find differentially expressed genes in samples from squamous cell carcinoma of the larynx. We observed significant increase or decrease of mRNA levels from 35 genes. Genes detected were involved in processes as cell cycle, apoptosis, DNA repair, protease inhibition, proteolysis and transcription regulation. Our findings may help to form the basis for a molecular comprehension of larynx cancer, once our array analysis is the first to obtain the gene expression profile from larynx tumor samples.

Material and Methods

cDNA microarray construction

We selected 139 genes previously identified by Head and Neck Annotation Consortium⁴¹ to be spotted into a cDNA microarray. The criteria for selection of the genes were based on known mapping information. Thus, genes that map to loss or gain regions involved in head and neck carcinogenesis, according to Knuutila *et al*⁴², were selected.

The cDNA of Hep2 (Human laryngeal carcinoma) cell line served as template for the amplification of these sequences. Gene-specific primers for PCR were designed using the Primer 3.0 program (provided by Whitehead/MIT center for Genome Research, Cambridge, MA).

In brief, for the PCR, 4 μ L cDNA was mixed with 10.0 μ L 10x buffer, 4 μ L PCR primer (10 pmol/ μ L), 16 μ L dNTPs (1.25 mM), 3 μ L MgCl₂ (50 mM) and 0.8 μ L Taq DNA Platinum (Invitrogen). The volume was adjusted to 100 μ L with water. PCR conditions were: 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min.

Products obtained by PCR were of about 600 bp. From all products, 5µL were fractionated through a 1% agarose gel in order to measure control DNA products and the remaining 95µL were purified by filtration on Multiscreen plates (Millipore cat. # MAFB NOB 50). cDNA samples were diluted 1:1 in DMSO and spotted at high density into silane-coated, reflective Type-7 glass slides (Molecular Dynamics) using a GenIII microarray spotter robot (Molecular Dynamics). Following spotting, cDNAs were fixed to slide surface by UV cross-linking (500 mJ) and kept on a low humidity environment until use.

Based on the informatics analysis of the HN transcriptome⁴¹, an additional set of 201 cDNA clones were included in the array, comprising candidates for LOH in HN tumors (149 sequences), as well as transcripts with no similarity to known human genes expressed in HN tissues (52 sequences). The clone collection is stored frozen in bar-coded 96-well plates, and selected clones were re-arrayed also with an automated robotic operation. cDNA fragments were generated from these clones by PCR amplification with universal primers.

Each sequence is spotted in 6 replicates on the microarrays. A complete list of the cDNA clones present in the array and annotations is provided at <http://www> (página em construção).

Patient samples

This work was approved by National Research Ethics Committee and written informed consent was obtained from all individuals prior to sample collection.

Thus, a total of 15 larynx tumor samples and 10 non-matched normal samples were obtained at the time of surgery from Arnaldo Vieira de Carvalho Hospital. They were immediately snap-frozen in liquid nitrogen.

Patient clinical data and tumor characteristics are described in Table 1.

Medical records were examined to obtain clinical and histopathologic information for each patient, including age, sex, histopathologic diagnosis, history of tobacco and alcohol

consumption. Tumors were staged according to the current TNM classification as recommended by the UICC⁴³.

Prior to RNA extraction, samples were re-examined and giemsa stained micro-sections obtained from each side of the frozen block were used to delimit the spatial distribution of the tumor mass or normal tissue. Microdissections were performed to ensure that more than 70% of isolated RNA was derived from cancer cells. In the case of surgical margins, only the epithelial tissue was used.

Micro-dissected tumor samples and normal samples were returned to liquid nitrogen until use.

Common reference

Each tumoral or normal experimental sample was assayed versus a common reference sample consisting of a pool of total RNA isolated from samples of normal necropsies larynx. To perform this total RNA pool, aliquots of equal amounts of RNA from 5 normal necropsies larynx samples were pooled, in order to minimize the effect of biological diversity.

RNA extraction

Tumor and normal tissues and common reference frozen in liquid nitrogen were pulverized using a mortar pestle. Next, total RNA was isolated from tissue specimens and Hep2 cell culture using TRIzol reagent (Gibco BRL Life Technologies). Total RNA was precipitated by incubating with 0.5 mL of isopropyl alcohol for 10 min followed by centrifugation at 12,000 xg for 10 min at 4°C. The pellet was washed with 75% ethanol, solved in RNase-free water, passed through an RNeasy spin column (Qiagen) for purification and stored at -80°C until further use.

RNA quantity and quality were evaluated using spectrophotometer, 1% agarose gel electrophoresis and also a microelectrophoresis on Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). RNA from all samples was of appropriately high quality for cDNA microarray analysis.

cDNA Labeling

Labeled targets for hybridizations were generated from poly(A)+ mRNA in reverse transcription reactions using oligo-dT primers, following strictly the protocol accompanying the CyScribe Post-labeling kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Briefly, 15 µg of total RNA was mixed with 4 µL anchored oligo (dT) (500µg/mL), in a total volume of 11 µL, subsequently denatured at 70°C for 5 min. put on ice for 30 seconds, spin down and placed at room temperature for 10 minutes.

Following, 1 µL of dNTP Mix, 1 µL of aminoallyl-dUTP, 2µL of 0,1 M DTT, 1µL of RNaseOUT (40U/µL), 4µL of 5X CyScript buffer and 1µL of CyScript reverse transcriptase (200U/µL) were added. The volume was adjusted to 20 µL with water. After incubation for 3 hr at 42°C, RNA was hydrolyzed by adding 2 µL of 2.5N NaOH for 15 min at 37°C. Samples were then neutralized with 10 µL of 2 M HEPES free acid, and reactions were purified using 96-well Millipore Multiscreen filter plates as follows: 5 volumes of 5.3 M Guanidine-HCl: 150 mM KOAc were added to labeling reactions. The mixture was applied on the plate and washed 4X with 80% EtOH by centrifugation at 3500 rpm for 5 min. Residual EtOH was spin out by an additional centrifugation at 3,500 rpm for 5 minutes. Labeled targets were eluted in 50 µL 10 mM Tris pH 8.5, by spinning at 3,000 rpm for 5 minutes, dried on a SpeedVac and kept at -20°C, protected from light until use. Next, cDNA were resuspended in 40 µL of 0,1 M NaHCO₃ and reacted with monoreactive Cy3 or Cy5 dye. The reaction was incubated for 2 h at room temperature and purified.

Microarray hybridization

Labeled targets were resuspended in 250 µl of 1x hybridization buffer (25% formamide, 12.5% of proprietary Microarray Hybridization Buffer Version 2 (Amersham Biosciences) denatured for 2 min at 92 °C and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The Cy3 (common reference) and Cy5 (tumor or normal sample) labeled cDNA were combined and hybridizes on an Automated Slide Processor (ASP) from Amersham Biosciences. Thus, each chip was then hybridized with a pair of cDNA - common reference and tumor or normal tissue. The slides were incubated for 16h at 42°C. Following hybridization, slides were washed (1.0× SSC, 0.2% SDS 10 min. at 55°C, 0.1× SSC, 0.2% SDS 10 min. at 55°C, 0.1× SSC, 0.2% SDS 10 min. at 55°C, 0.1× SSC 1 min. at RT, 0.1× SSC 1 min at RT, dH₂O 10 sec. at RT) and dried with a N₂ stream.

Data measurement

Processed slides were scanned with a PMT setting of 700 V (GenIII Scanner – Amersham Biosciences) and background-subtracted artifact-removed median intensities of both Cy3 and Cy5 emissions were extracted for each spot from raw images using ArrayVision v.7.2 software (Imaging Research Inc., Ontario, Canada).

An array grid was first automatically aligned to locate the position of each spot in the array, and subsequently manually adjusted to obtain the best possible alignment.

Data normalization

Since we did not obtain good quality, reproducible signals from Cy3-labeled targets, we opted not to use the reference RNA intensity data for data normalization, and use only the intensity data derived from Cy5-labeled test samples. To make experiments comparable, intensity data from different hybridizations were normalized by Lowess, local weighted scatter-plot smoothing.⁴⁴ Intensity data from a sample with total energy comparable to the

average intensity of all samples was used as a reference in the Lowess normalization procedure.

Statistical analysis of microarray data

To identify genes with expression significantly altered in larynx tumors, a Signal-to-Noise Ratio (SNR) metric⁴⁵ was used to compare the expression intensity data from tumor and non-tumor samples. The SNR parameter essentially is a measure of signal strength relative to background noise. The distance between the two groups was measured by a signal- (expression intensity) to-noise (variation) ratio. The signal-to-noise comparison gives an indication of the level of separation for the means of the two distributions defining the gene intensities of the two groups, and it was calculated as $SNR = \sqrt{2(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)/(S_1 + S_2)}$, where $\bar{X}_1$ and $\bar{X}_2$ are the mean intensities of tumor and non-tumor groups, respectively, and S_1 and S_2 the corresponding standard deviations. For each gene, higher absolute SNR values indicate a higher difference of expression between tumor and non-tumor samples with a lower dispersion within each group. A cutoff $SNR \geq 11$, $p\text{-value} \leq 0.001$ was used to select differentially expressed genes. Statistical significance of the differential expression ($p\text{-values}$) was ascertained by bootstrap re-sampling, i.e. by re-calculating SNR values following 10,000 pairs of random samples with replacement of the same sizes of the groups.

Expression profiles of selected transcripts were grouped using hierarchical clustering (UPGMA with Euclidean distance) and visualized using a software (Spotfire Decision Site; Spotfire, Somerville, MA, USA).

Validation by quantitative Real Time RT-PCR

For an independent validation of the array data, we selected fourteen genes which were down-regulated in tumor tissues by microarray analysis. cDNA sequence for each gene

were selected from international published databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gene-specific primers for real time RT-PCR were designed for optimal hybridization kinetics using the Primer 3.0 program (provided by Whitehead/MIT center for Genome Research, Cambridge, MA). Amplification primers were designed into different exons to avoid amplification of any contaminating genomic DNA. The primer sequences are showed on the Table II.

For validation were utilized 15 tumor samples (T1 to T15) and 1 pool of total RNA from a subset of 7 normal mucosa samples adjacent to tumors, denominated normal reference.

Double-stranded cDNA was synthesized from total RNA using High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) according to the manufacture's instructions. Real-time PCR was performed using ABI prism 7300 sequencer detector system and SybrGreen PCR Core Reagent (Applied Biosystems) following the manufacture's protocol. In brief, the reaction mixture (20 µl total volume) contained 25 ng of cDNA, gene-specific forward and reverse primers for each gene a 0,4 µM or 0,5 µM final concentration and 10 µL of 2x Quantitative Sybr Green PCR Master Mix. The relative quantification is given by the CT values, determined for triplicate reactions for tumor samples and reference sample from each gene and for the control endogenous (α -tubulin). Thus, the fold-change of each gene was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula, where CT = fluorescence at the defined detection threshold; ΔCT = CT of the target gene – CT of the endogenous control, α -tubulin; $\Delta\Delta CT$ = ΔCT (tumor sample) – ΔCT (reference sample). For the tumor sample, evaluation of $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicates the fold change in gene expression relative to the reference sample.

Statistical analysis of quantitative real time RT-PCR data

Statistical analysis was performed using Minitab software, version 12.22, and significance level was defined as $\alpha = 0.05$. Relative expression levels detected by quantitative real-time RT-PCR for the 14 genes in samples from larynx carcinoma were transformed in

natural logarithms. Next, Anderson-Darling normality test was performed to determine whether the values present a normal distribution or not. As this test did not reject normality for all genes, data were subjected to a one-sample Student t-test on the their expression levels at logarithm scale.

Results

Epidemiology

The study population included 14 males and 1 female with larynx carcinoma. The minimum and maximum ages were 44 and 73 years, respectively, with the average age of 58.66 ± 9.84 years. According to UICC stage, there were 1 patient of T2, 2 patients of T3 and 12 patients T4. Neck stage included 7 patients of N0, 2 patients of N1 and 6 patients of N2. Thus, 93.33% of patients had T3-T4 tumors and 60.00% had regional metastases at presentation. None of the patients had distant metastases at disease diagnostic. In relation to the clinical stage, 3 patients had stage III and 12 had stage IV. Six patients had no clinical evidence of disease at the last follow-up and 8 patients had disease recurrence. The recurrence occurred between 4 and 14 months after surgery. Our data are in accordance with the literature, once 40-50% of patients with advanced disease (stage III and IV) recur, and approximately 80% of recurrences occur within the first two years. Regarding the risk factors, 100% smoked tobacco and 94.11% drank alcohol. Therefore, most of these patients have a history of smoking and alcohol consumption, which are the major etiological causes of larynx cancer. Data are showed in Table I.

Gene expression analysis of larynx tumors

Expression analysis using cDNA microarray containing 340 sequences was applied to 8 larynx tumor samples (T1-T8) and 4 larynx normal samples. For each tumor or normal sample we generated one expression profile against a common reference pool.

Differentially expressed genes were identified using the Signal-to-Noise Ratio (SNR) metric as described above. Out of the set of 340 genes analyzed, 35 (10.29%) showed statistically significant differences in expression between tumor and non-tumor adjacent tissue of larynx ($\text{SNR} \geq |1.0|$, $p\text{-value} \leq 0.001$). Of the 35 genes, 19 (54.29%) were overexpressed in tumoral tissue and underexpressed in normal tissue, and 16 (45.71%) were underexpressed in tumoral tissue and overexpressed in normal tissue.

Supervised hierarchical clustering analysis revealed that the expression patterns of the selected set of 35 differentially expressed genes were able to distinguish perfectly tumors from non-malignant tissues in the set of samples used to identify the signature in this training set (Fig 1, 2 and 3). To verify the robustness of the 35-gene signature, we asked if this gene set was able to separate tumor from non-tumor larynx tissues using data from an additional set of 5 larynx tumor samples (T9, T10, T11, T14 and T15) and 6 adjacent non-tumor larynx tissues. As is apparent in Figure 4, the 35-gene set was able to separate larynx samples according to their histological type, thus confirming the robustness of this gene classifier.

For gene functional classification we consulted the <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. We observed that genes detected were involved in processes such as apoptosis, cell adhesion, cell cycle, cell motility, DNA repair, metabolism, proteolysis, signal transduction and transcription regulation. Thus, of the 19 genes overexpressed, 2 were involved in signal transduction, 2 in transcription regulation, 1 in apoptosis, 1 in catabolism, 1 in cell adhesion, 1 in chromatin modification, 1 in folding protein, 1 in metabolism, 1 in response to stimulus and 8 were of unknown functions. Of the 16 underexpressed, 2 were involved in cell cycle, 2 in DNA repair, 1 in apoptosis, 1 in biosynthesis, 1 in cell adhesion, 1 in immune response, 1 in protease

inhibition, 1 in proteolysis, 1 in transcription regulation, 1 in transport, and 4 were of unknown functions. These data are presented in Table III.

Apparently, hierarchical cluster analysis classified the tumors from the training group into 2 subgroups, suggesting heterogeneity among larynx cancer cases. Separation of these samples into 2 groups does not seem to correlate with the clinical staging or metastatic features of the tumors. Conversely, we observed a statistically significant difference (p -value = 0.030) in the average age of presentation of the disease of patients in each of the two groups. In one group the patients had between 44 the 58 years (51 ± 5.47) and in the other group the patients had between 61 the 73 years (68.50 ± 4.67).

Quantitative real-time RT-PCR results

To validate gene expression found using independent methods, we used quantitative real-time RT-PCR. We compared the relative expression levels of 14 genes (*ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CLK1*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *IL18BP*, *MAP3K5*, *PLAT*, *PTPRS*, *UBL1*, *XRCC5*, *ZNF706*) using triple determination and normalization based on *alfa-tubulin* level. Data were analyzed using Student t-test. Seven genes were statistically underexpressed in tumor samples compared to normal reference, while three genes were statistically overexpressed. These data are presented in Table IV and Fig 5.

Thus, we found that *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5* and *PLAT* genes are significantly down-regulated in tumor tissues compared to normal reference (p -value = 0.012; 0.000; 0.000; 0.000; 0.000; 0.014 and 0.000, respectively). All these genes, except *ALS2CR3*, were located in regions of chromosome losses involved in head and neck carcinogenesis. The results of RT-PCR were in accordance with those of cDNA microarray analysis, suggesting that the data obtained by the microarray gene expression analysis were valid and that these genes could potentiality serve as cancer related-genes.

We found also that *CRR9*, *UBL1* and *ZNF706* genes are significantly up-regulated in tumor tissues when compared to normal reference (p -value = 0.011; 0.007 and 0.001, respectively). Thus, these genes displayed opposite expression patterns to cDNA microarray analysis. All these genes were located in regions of chromosome gains involved in head and neck carcinogenesis.

However, *CLK1*, *IL18BP*, *PTPRS* and *XRCC5* genes did not show differentially expressed by quantitative real-time RT-PCR (p -value = 0.406; 0.222; 0.083 and 0.340, respectively).

Discussion

Identification of differential gene expression between normal and malignant tissue is the basis for a comprehensive understanding of the carcinogenic process and may contribute to the discovery of new biomarkers. Microarray technology can improve the accuracy of the classical diagnostic techniques by suggesting novel tumor-specific markers.²⁵

The current literature reveals several studies that incorporated DNA microarray analysis in the study of HNSCC to determine gene expression changes during disease progression and/or to predict outcome of disease. Nevertheless, there is considerable heterogeneity among these studies in terms of study design, number of samples, sites and stage of disease, choice of microarray platform and validation of results by other laboratory methodologies.⁷ Many studies in HNSCC have been performed using tumors from various anatomical sites, however carcinomas from different upper aerodigestive tract sites may behave differently and results may be misleading when analyzed together. Larynx cancer is one of the most common types of HNSCC with high mortality rates and poor prognosis.⁴⁶ Therefore, in our study, we have examined the expression levels of 340 genes only in samples of normal larynx and larynx squamous cell carcinoma by microarray technology and we identified 35 as regulated differentially between tumors and normal. Genes detected are

involved primarily in processes such as apoptosis, cell cycle, DNA repair, proteolysis, protease inhibition, signal transduction and transcription regulation.

The validity of the microarray data was further confirmed by real-time PCR on a set of fourteen genes which were down-regulated in tumor tissues by microarray analysis. Not all of the genes analyzed by microarray showed similar patterns of expression by real-time RT-PCR. Thus, out of the 14 selected genes tested by both microarray and real time RT-PCR, 7 showed congruent and significant differences, 3 displayed opposite expression patterns, while 4 did not exhibit any significant change in expression by real time RT-PCR. One possible source of variation in the magnitude of mRNA expression between microarray and real-time RT-PCR may be differential mRNA splicing which may affect the transcript levels detected at different regions of mRNA by these two techniques.⁴⁷ Therefore, real-time RT-PCR validation of high-throughput gene microarray screening is important and necessary before further conclusions on gene expression can be drawn.⁴⁸

Thus, 10 biomarkers were validated in our study according to pronounced differences in expression between tumor samples and reference sample. The validated markers were the genes *ADCY6*, *AES*, *AL2SCR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* and *ZNF706*.

Expression of *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5* and *PLAT* genes were significantly lower in tumor tissues than in normal reference. All these genes, except *ALS2CR3*, were located in regions of chromosome losses involved in head and neck carcinogenesis.

ADCY6 gene, located on 12q14.1, encodes adenylate cyclase 6, which is a membrane-associated enzyme and catalyzes the formation of the secondary messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP). No information is available in the literature on *ADCY6* expression in head and neck cancer, however Celano *et al.*⁴⁹ observed that its expression is significantly lower in hyperfunctioning thyroid tumor than in normal thyroid tissue, evidencing low expression of this gene in transformed tissues.

The amino-terminal enhancer of split (*AES*) gene, located on 19p13, encodes a 197-amino acid protein that is homologous to the NH(2)-terminal domain of the *Drosophila* Groucho protein but lacks COOH-terminal WD40 repeats. According to data of Tetsuka *et al.*⁵⁰ *AES* acts as a co-repressor for *NF-kappaβ*, which is well recognized as a regulator of genes encoding cytokines, chemokines and cell adhesion molecules important in immune and inflammatory responses, as well as critical genes in the control of cellular proliferation and apoptosis.⁵¹ Additionally, *AES* also inhibited *NF-kappaβ*-dependent gene expression induced by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1, which is an upstream kinase for *NF-kappaβ* activation.⁵⁰

There is evidence that nuclear factor kappaβ modulates a broad programme of genes differentially expressed during tumour progression of HNSCC, such as *CCND1* (*PRADI*), *Gro-1* (*IL-8* homologue) and *GST*.⁵² Thus, *AES* gene may play a role in the head and neck carcinogenesis, once this gene acts in the regulation of *NF-kappaβ* and its target genes.

Moreover, *AES* gene acts also on Wnt receptor signaling pathway. The nuclear output of Wnt signaling is mediated by a complex between DNA-binding proteins of the TCF family and the transcriptional coactivator β -catenin. The Wnt/ β -catenin/Tcf pathway serves important functions in embryonic development and is constitutively activated in human colorectal cancer.^{53,54} Groucho proteins, which includes *AES*, act to repress transcriptional activation by β -catenin-tcf complex, probably by interacting directly with Tcf transcription factors.⁵³ Hence, the low expression of *AES* gene may be contributing to a higher activation of the Wnt/ β -catenin/Tcf signaling model and consequently to larynx carcinogenesis, likewise occurs in colorectal cancer.

ALS2CR3 gene, located on 2q33.1, is also denominated *GRIF-1* and *TRAK2*. This gene codifies a factor that interacts with Gamma-aminobutyric acid(A) receptor and also play a role

in the intracellular transport, mainly in kinesin-mediated transport of mitochondria.⁵⁵ Alterations of this gene have been associated with neurodegenerative diseases.⁵⁶ However, there are no in the literature studies that describe alterations of *ALS2CR3* in tumor tissues currently.

Cystatin B, also called Stefin B, is a small protein that is a member of the superfamily of cysteine protease inhibitors. Cystatins have emerged as important players in a multitude of physiological and patho-physiological settings that range from cell survival and proliferation, to differentiation, cell signaling and immunomodulation.⁵⁷ Cysteine proteases, in turn, have been implicated in multiple steps of tumor progression, including early steps of immortalization and transformation,⁵⁸ intermediated steps of tumor invasion and angiogenesis,⁵⁹ and late steps of metastasis and drug resistance.⁶⁰ The importance of lysosomal cysteine proteases in the development of tumors from benign to aggressive lesions suggest that cystatins may in many ways safeguard against tumor progression.⁵⁷

The low expression of *CSTB* (cystatin B) gene, located on 21q22.3, has been reported in 5 HNSCC microarray studies in a recent review on gene expression profiles comprising 24 HNSCC studies.⁷ The decrease of *CSTB* also was observed in esophageal carcinoma, breast cancer, prostatic adenocarcinomas and atypical meningiomas.⁶¹⁻⁶⁴

DUSP1 gene, also referred to as *MSP-1* and located on 5q35.1, encodes a dual-specificity phosphatase for tyrosine and threonine.⁶⁵ This gene inactivates specifically mitogen-activated protein kinase and suppresses its activation by *ras*. *DUSP1* gene is also a transcriptional target of tumor suppressor p53, inducing cell cycle arrest or apoptosis. Consequently, *DUSP1* may play an important role in the negative regulation of cellular proliferation.^{65,66}

Low expression of this gene was observed in ovarian and prostate cancer.^{67,68} Moreover, Tomioka *et al.*¹¹ likewise our study, also observed low expression of this gene in head and neck cancer. The authors considered *DUSP1* a candidate for tumor-suppression,

mediating PTEN signaling pathways. Unoki and Nakamura⁶⁹ reported that *DUSP1* gene expression was induced by the introduction of exogenous *PTEN* into endometrial cancer cell lines.

In addition, *DUSP1* plays a vital role in the regulation of innate immune responses via the p38 MAPK and JNK pathways⁷⁰ and seems to play a role in the induction of senescence through inhibition of AP-1 activity and the subsequent transcription of genes involved in DNA replication.⁷¹

MAP3K5 gene, located on 6q25.1 and also denominated *ASK1* (Apoptosis signal-regulating kinase 1), codifies a multifunctional serine/threonine kinase involved in a broad range of biological activities including cell differentiation and stress-induced apoptosis.^{72,73} Its catalytic activity can be activated by many stress-stimuli such as tumor necrosis factor α (TNF- α), reactive oxygen species (ROS), DNA damage and chemotherapeutic agents like cisplatin and taxol, and selectively activates JNK and p38 MAPK pathways.⁷⁴

The *MAP3K5* proapoptotic role is reinforced by Dasgupta *et al.*⁷⁵ and Kerrouche *et al.*⁷⁶ Dasgupta *et al.*⁷⁵ described a physical and functional interaction between MAP3K5 and the Rb protein in response to apoptotic stimuli. The Rb protein has antiproliferative and antiapoptotic functions. It appears that MAP3K5 has to overcome RB functions to induce apoptosis; further, MAP3K5-mediated inactivation of Rb correlates with increased levels of the proapoptotic protein p73. Kerrouche *et al.*⁷⁶ suggest that the overexpression of *E2F1* induces the expression of *MAP3K5* and that some of the cellular functions of MAP3K5 may be under the control of E2F transcription factor. Moreover, the authors suggest that the up-regulation of *MAP3K5* may also favour the p53-independent E2F1 apoptotic activity. However, no information is available in the literature about *MAP3K5* expression in head and neck cancer.

PLAT gene, located on 8p11.21, encodes tissue-type plasminogen activator, a secreted serine protease which converts the proenzyme plasminogen to plasmin, a fibrinolytic

enzyme.⁷⁷ Numerous studies have provided evidence that plasminogen activators (PA)/plasmin systems represent a key event in angiogenesis. It is well established that tumor-induced neovascularization, angiogenesis, is an absolute requirement for the growth of tumors and of their metastases. The PA/plasmin system comprises two major types of PA, tissue PA (PLAT) and urokinase PA (PLAU).⁷⁸

However, by contrast to *PLAU*, for which considerable evidence indicates that upregulation of the enzyme correlates with aggressiveness of tumors, several observations suggest that high *PLAT* levels rather correlate with good prognosis in melanoma and breast cancer, whereas lower *PLAT* levels have been associated with malignant tumors.^{79,80} This suggest that increase in either *PLAT* activity or expression levels may be beneficial, possibly due to the overstimulation of plasmin generation by *PLAT* that may induce the degradation of the pro-angiogenic fibrin matrix, resulting in the inhibition of angiogenesis.^{81,82} Moreover, Gingras *et al.*⁸² and Gingras *et al.*⁸³ reported that Neovastat, an inhibitor of angiogenesis derived from shark cartilage, specifically stimulates *PLAT*-dependent plasmin generation through an increase in the affinity of the enzyme towards plasminogen.

Expression of *CRR9*, *UBL1* and *ZNF706* genes were significantly higher in tumor tissues than in normal reference. All these genes were located in regions of chromosome gains involved in head and neck carcinogenesis.

CRR9 gene, located on 5pter15.33, has unknown function. However, high expression of *CRR9* gene, was also observed in cell line of renal carcinoma when compared with the normal cells, as well as in cell line of ovary cancer resistant to the treatment with cisplatin.^{84,85} However, no information is available in the literature on *CRR9* expression in head and neck cancer.

UBL1 gene, also referred to as *SUMO-1* and located on 2q33.1, is likely to be involved in many cellular processes, including apoptosis, regulation of mitosis, protein translocation, cell proliferation and transcriptional regulation. One function of *UBL1* protein

is to conjugate covalently with target proteins and modify their function. In consequence, in nucleus, the transcriptional activities of UBL1 modified transcriptional factors, including p53, c-jun, Sp-3, c-Myc and c/EBP families, were reduced.^{86,87}

UBL1 protein also forms a complex with RAD51 and RAD52 proteins in human cells, which plays essential roles in DNA homologous recombination, DNA repair and cell proliferation. Overexpression of *UBL1* down-regulates DNA double-strand break-induced homologous recombination in CHO cells and reduces cellular resistance to ionizing radiation. Overexpression of *UBL1* also reduces the fraction of bidirectional gene conversion tracts, and overexpression of a mutant *UBL1* that is incapable of being conjugated retains the ability to inhibit homologous recombination.⁸⁸ These results suggest a regulatory role for *UBL1* in homologous recombination.

Moreover, UBL1 protein also repressed *MAPK5* activation through physical interaction.⁸⁹ Therefore, *UBL1* overexpression may contribute to carcinogenesis both by decreasing DNA repair capacity as by inhibiting *MAP3K5* activation and consequently the apoptosis. For instance, no information is available in the literature on *UBL1* expression in head and neck cancer, however, high expression of *UBL1*, was observed in cell line of renal carcinoma when compared with the normal cells.⁹⁰

Zinc finger gene family belongs to one of the biggest families of transcription factors. Most zinc finger proteins can bind to specific DNA sequences and are involved in the transcriptional regulation of gene expression. Members of the zinc finger family function as activators or repressors of gene transcription, and therefore regulate embryonic development as well as a variety of physiological processes in the adult.⁹¹ The zinc-finger-containing transcription factors have been previously revealed to be involved in the regulation of the MAPK signaling pathways, which are among the most widespread mechanisms of eukaryotic cell regulation.⁹² However, no information is available in the literature on *ZNF706* expression in cancer.

According to the holistic model of cancer by Hanahan and Weinberg,⁹³ a malignant cell has to acquire 6 biological alterations to dictate pathogenesis, namely self-sufficiency in proliferative growth signals, insensitivity to growth inhibitors signals, evasion of apoptosis, limitless replicative potential, sustained angiogenesis and the induction of invasion. In support of this model, our study shows a set of differentially expressed genes, especially *AES*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1*, that can directly or indirectly feed these pathways.

However, among the differentially expressed genes, we emphasize *CSTB*. Interestingly, this gene showed low expression in all tumor samples analyzed by microarray and real time RT-PCR. *CSTB* gene has anti-metastatic function, since it can inhibit the action of lysosomal cysteine proteases. Despite mounting evidence showing that expression of lysosomal cysteine proteases are aberrant in tumor cells when compared to normal cells, this class of proteases has received little attention⁵⁷ The emphasis was placed on metalloproteases as potential novel targets for anti-cancer chemotherapy. However, clinical trials of cancer patients showed no indication that metalloprotease inhibitors are successful.⁹⁴ This has led to a growing interest in members of the cystatin superfamily for potential novel anti-cancer strategies. Recent pre-clinical studies indeed are promising.⁹⁵ Several clinical studies have shown that some cathepsin and/or cystatins may have diagnostic and/or prognostic value in a variety of cancer.^{63,64,96}

Once, loco-regional relapse and metastasis appear to be the major contributing factors for restricted survival of the HNSCC patients¹, we suggest that *CSTB* gene consists in a good biomarker for larynx cancer and requires more attention in future studies.

In conclusion, our array analysis is the first to obtain the gene expression profile from larynx tumor samples and normal mucosa and our results suggest that genes expression profiling can determine deregulation in multiple genes potentially associated with disease development. These findings may help to form the basis for a molecular comprehension of

larynx cancer, thus improving diagnosis, treatment and outcome for patients with this carcinoma.

References

1. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, Castro G Jr, Awada A. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 2006;28:256-69.
2. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:9-17.
3. Chung CH, Levy S, Yarbrough WG. Clinical applications of genomics in head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28:360-68.
4. INCA - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em <http://www.inca.org.br>.
5. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:127-35.
6. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 2007;86:104-14.
7. Choi P, Chen C. Genetic expression profiles and biology pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2005;104:1113-28.
8. Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 2004;64: 55-63.
9. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley WW, Weissler MC, Dressler LG, Shores CG, Yarbrough WG, Perou CM. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 2004;5:489-500.
10. Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Van Spaendonk RM, Concus A, Carey TE, Benninger MS. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:702-8.
11. Tomioka H, Morita K, Hasegawa S, Omura K. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006;35:206-11.
12. Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2004;112:545-53.

13. Angadi PV, Krishnapillai R. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: correlation with histological differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:30-5.
14. Kalyankrishna, Grandis. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24:2666-72.
15. Ruiz-Godoy RLM, Garcia-Cuellar CM, Herrera Gonzalez NE, Suchil BL, Perez-Cardenas E, Sacnchez-Perez Y, Suarez-Roa ML, Meneses A. Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:73-8.
16. Papakosta V, Vairaktaris E, Vylliotis A, Derka S, Nkenke E, Vassiliou S, Lazaris A, Mourouzis C, Rallis G, Spyridonidou S, Anagnostopoulou S, Perrea D, Donta I, Yapijakis C, Patsouris E. The co-expression of c-myc and p53 increases and reaches a plateau early in oral oncogenesis. *Anticancer Res* 2006;26:2957-62.
17. Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, Turek LP. p16(INK4a) Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2007 Mar 12; [Epub ahead of print].
18. Keum KC, Chung EJ, Koom WS, Cho JH, Cho SH, Choi EC, Lee CG, Suh CO, Kim GE. Predictive value of p53 and PCNA expression for occult neck metastases in patients with clinically node-negative oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;135:858-64.
19. Hirai T, Hayashi k, Takumida M, Ueda T, Hirakawa K, Yajin K. Reduced expression of p27 is correlated with progression in precancerous lesions of the larynx. *Auris Nasus Larynx* 2003;30:163-8.
20. Nemes J. A. p21^{WAF1/CIP1} expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005;34:274-79.
21. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002;9:369-78.
22. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Path* 2005;86:347-63.
23. Belbin TJ, Singh B, Smith RV, Socci ND, Wreesmann VB, Sanchez-Carbayo, Masterson J, Patel S, Cordon-Cardo C, Prystowsky MB, Childs G. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:10-8.
24. Squire JA, Bayani J, Luk C, Unwin L, Tokunaga J, MacMillan C, Irish J, Brown D, Gullane P, Kamel-Reid S. Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: by comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. *Head Neck* 2002;24:874-87.
25. Perez-Diez A, Morgun A, Shulzhenko N. Microarrays for cancer diagnosis and classification. *Adv Exp Med Biol* 2007;593:74-85.

26. Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, Gallagher GT, Varvares M, Cohen D, Kim D, Kent R, Donoff RB, Todd R, Yung CM, Warrington JA, Wong DT. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarrays analysis. *Oncogene* 2001;20:6196-204.
27. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black MJ, Sladek R, Foulkes WD. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:2634-40.
28. Belbin TJ, Singh B, Barber I, Socci N, Wenig B, Smith R, Prystowsky MB, Childs G. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Res* 2002;62:1184-90.
29. El-Naggar AK, Kim HW, Clayman GL, Coombes MM, Le B, Lai S, Zhan F, Luna MA, Hong WK, Lee JJ. Differential expression profiling of head and neck squamous carcinomas: significance in their phenotypic and biological classification. *Oncogene* 2002;21:8206-19.
30. Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, Henderson Y, Arumugam J, Spring PW, et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:754-59.
31. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, Pevsner J, Westra WH, Califano J. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:3058-64.
32. Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, Ohnishi M, Ohyama T, Shingaki S, Kaji M, Saku T, Takagi R. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106:683-89.
33. Irie T, Aida T, Tachikawa T. Gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma using laser microdissection and cDNA microarray. *Med Electron Microsc* 2004;37:89-96.
34. Jeon GA, Lee JS, Patel V, Gutkind JS, Thorgeirsson SS, Kim EC, Chu IS, Amornphimoltham P, Park MH. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004;112:249-58.
35. Kuriakose MA, Chen WT, He ZM, Sikora AG, Zhang P, Zhang ZY, Qiu WL, Hsu DF, McMunn-Coffran C, Brown SM, Elango EM, Delacure MD, Chen FA. Selection and validation of differentially expressed genes in head and neck cancer. *CMLS* 2004;61:1372-83.
36. Warner GC, Reis P, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, Makite AA, Grénman, Reid N, Sukhai M, Freeman J, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlates with nodal metastasis. *Int J Cancer* 2004;110:857-68.

37. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, Campbell CM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;113:789-97.
38. Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Kooile R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ, Holstege FC. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2005;37:182-86.
39. Dysvik B, Vasstrand EN, Lovlie R, Elgindi OA, Kross KW, Aarstad HJ, Johannessen AC, Jonassen I, Ibrahim SO. Gene expression profiles of head and neck carcinomas from Sudanese and Norwegian patients reveal common biological pathways regardless of race and lifestyle. *Clin Cancer Res* 2006;12:1109-20.
40. Kainuma K, Kainuma K, Katsuno S, Hashimoto S, Oguchi T, Suzuki N, Asamura K, Usami S. Differences in the expression of genes between normal tissue and squamous cell carcinomas of head and neck using cancer-related gene cDNA microarray. *Acta Otolaryngol* 2006;126:967-74.
41. Reis EM, Ojopi EP, Alberto FL, Rahal P, Tsukumo F, Mancini UM, Guimaraes GS, Thompson GM, Camacho C, Miracca E, Carvalho AL, Machado AA, Paquola AC, Cerutti JM, da Silva AM, Pereira GG, Valentini SR, Nagai MA, Kowalski LP, Verjovski-Almeida S, Tajara EH, Dias-Neto E, Bengtson MH, Canevari RA, Carazzolle MF, Colin C, Costa FF, Costa MC, Estecio MR, Esteves LI, Federico MH, Guimaraes PE, Hackel C, Kimura ET, Leoni SG, Maciel RM, Maistro S, Mangone FR, Massirer KB, Matsuo SE, Nobrega FG, Nobrega MP, Nunes DN, Nunes F, Pandolfi JR, Pardini MI, Pasini FS, Peres T, Rainho CA, dos Reis PP, Rodrigus-Lisoni FC, Rogatto SR, dos Santos A, dos Santos PC, Sogayar MC, Zanelli CF; Head and Neck Annotation Consortium. Large-scale transcriptome analyses reveal new marker candidates of head, neck, and thyroid cancer. *Cancer Res* 2005;65:1693-99.
42. Knuutila S, Autio K, Aalto Y. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. *Am J Pathol* 2000;157:689.
43. International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours, 6th ed. New York:Wiley-Liss, 2002.
44. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 2002;32:496-501.
45. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537.
46. Vokes EE, Stenson KM. Therapeutic options for laryngeal cancer. *N Engl J Med* 2003;349: 2087-9.
47. Hedge PS, White IR, Debouck C. Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:647-51.

48. Liew KJL, Chow VTK. Microarray and real-time RT-PCR analysis of a novel set of differentially expressed human gene in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *J Virol Meth* 2006;131:47-57.
49. Celano M, Arturi F, Presta I, Bruno R, Scarpelli D, Calvagno MG, Cristofaro C, Bulotta S, Giannasio P, Sacco R, Filetti S, Russo D. Expression cyclase types III and VI in human hyperfunctioning thyroid nodules. *Mol Cell Endocrinol* 2003;203:129-35.
50. Tetsuka T, Uranishi H, Imai H, Ono T, Sonta S, Takahashi N, Asamitsu K, Okamoto T. Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J Biol Chem* 2000;275:4383-90.
51. Chang AA, Waes CV. Nuclear factor-kappa β as a common target and activator of onogeneses in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:92-102.
52. Loercher A, Lee TL, Ricker JL. Nuclear factor-kB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:6511-23.
53. Lepourcelet M, Shivdasani RA. Characterization of a novel mammalian Groucho isoform and its role in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2002;277:47732-40.
54. Wong NACS, Pignatelli M. β -Catenin - A Linchpin in colorectal carcinogenesis. *Am J Pathol* 2002;160:389-401.
55. Brickley K. GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* 2005;280:14723-32.
56. Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 2001;29:166-73.
57. Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett* 2006;235:159-76.
58. Fehrenbacher M, Gyrd-Hansen B, Poulsen U, Felbor T, Kallunki T, Boes M. Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. *Cancer Res* 2004;64:5301-10.
59. Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N, Giraudo E, Tsai FY, Greenbaum DC, Hager JH, Bogyo M, Hanahan D. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004;5:443-53.

60. Zheng X, Chou PM, Mirkin BL, Rebaa A. Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L Cancer Res 2004;64:1773-80.
61. Shiraishi T, Mori M, Tanaka S, Sugimashi K, Akiyoshi T. Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma using displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. Int J Cancer 1998;79:175-78.
62. Levicar N, Kos J, Blejec A, Golouch R, Vrhovec I, Frkovic-Grazio S, Lah TT. Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinopathological data of breast carcinoma patients. Cancer Detect Prev 2002;26:42-9.
63. Mirtti T, Alanen K, Kallajoki M, Rinne A, Soderstrom, KO. Expression of cystatins, high molecular weight cytokeratin, and proliferation markers in prostatic adenocarcinoma and hyperplasia. Prostate 2003;54:290-98.
64. Trinkaus M, Vranic A, Dolene VV, Lah TT. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and Cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. Int J Biol Markers 2005;20:50-9.
65. Lin YW, Yang JL. Cooperation of ERK and SCF^{Skp2} for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferatin signaling. J Biol Chem 2006;281:915-26.
66. Li M, Zhou J, Ge Y, Matherly LH, Wu GS. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. J Biol Chem 2003;278:41059-68.
67. Denkert C, Schimitt WD, Berger S. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. Int J Cancer 2002;102:507-13.
68. Rauhala HE, Porkka KP, Tolonen TT, Martikainen PM, Tammela TLJ, Visakorpi T. Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. Int J Cancer 2005;117:738-45.
69. Unoki M, Namakmura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. Oncogene 2001;20:4457-65.
70. Abraham SM, Clark AR. Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune resposnses. Bioch Society Trans 2006;34:1018-23.
71. Hardy K, Mansfield L, Mackay A, Benvenutti S, Ismael S, Arora P, O'Hare MJ, Jat PS. Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. Mol Biol Cell 2005;16:946-53.
72. Subramanian RR, Zhang H, Wang H, Ichijo H, Miyashita T, Fu H. Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. Exp Cell Res 2004;294:581-91.

73. Mizumura K, Takeda K, Hashimoto S, Horie T, Ichijo H. Identification of Op18/stathmin as a potential target of ASK1-p38 MAP kinase cascade. *J Cell Physiol* 2006;206:363-70.
74. Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Bioch Mol Biol* 2007;40:1-16.
75. Dasgupta P, Betts V, Rastogi S, Joshi B, Morris M, Brennan B, Ordonez-Erean D, Chellappan S. Direct binding of apoptosis signal-regulating kinase 1 to retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 2004;279:38762-69.
76. Kherrouche Z, Blais A, Ferreira E, De Launoit Y, Monté D. ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a direct E2F target gene. *Biochem J* 2006;396:547-56.
77. Shim BC, Kang BH, Hong YK, Kim HK, Lee IH, Lee SY, Lee YJ, Lee SK, Joe YA. The kringle domain of tissue-type plasminogen activator inhibits in vivo tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:1155-62.
78. Pepper MS. Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2001;21:1104-17.
79. Ferrier CM, Suci S, van Geloof WL, Straatan H, Eggermont AAM, Koops HS, Kroon BBR, Lejeune FJ, Kleeberg UR, van Muijen GNP, Ruiter DJ. High t-PA-expression in primary melanoma of the limb correlates with good prognosis. *Br J Cancer* 2000;83:1351-59.
80. Chappuis PO, Dieterich B, Scietta V, Lohse C, Bonnefoi H, Remadi S, Sapino AP. Functional evaluation of plasmin formation in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:2731-38.
81. Reijerkerk A, Voest EE, Gebbink MFGB. No grip, no growth: The conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:1695-705, 2000.
82. Gingras D, Nyalendo C, Di Tomasso G., Annabi B, Béliveau R. Activation of tissue plasminogen activator gene transcription by Neovastat, a multifunctional antiangiogenic agent. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;16:205-12.
83. Gingras, D, Labelle D, Nyalendo C, Boivin D, Demeule M, Barthomeuf C, Béliveau R. The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) stimulates tissue plasminogen activator activity. *Investigational New Drugs* 2004;22:17-26.
84. Yamamoto, K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1148-54.
85. Asakura, T, Imai A, Ohkubo-Uraoka N, Kuroda M, Iidaka Y, Uchida K, Shibasaki T, Ohkawa K. Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2005;14:601-7.

86. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 2004;18: 2046-59.
87. Chen A, Wang PY, Yang YC, Huang YH, Yeh JJ, Chou YH, Chen JT, Hong YR, Li, SSL. SUMO regulates the cytoplasmic-nuclear transport of its target protein Daxx. *J Cell Biochem* 2006;98:895-911.
88. Li W, Hesabi B, Babbo A, Pacione C, Liu J, Chen DJ, Nickoloff JA, Shen Z. Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1145-53.
89. Lee YS, Jang MS, Lee JS, Choi EJ, Kim E. SUMO-1 represses apoptosis signal-regulating kinase 1 activation through physical interaction and not through covalent modification. *EMBO Rep.* 2005;6:949-55.
90. Lichtenfels R, Kellner R, Atkins D, Bukur J, Ackermann A, Beck J, Brenner W, Melchior S, Seliger B. Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1646:21-31.
91. Xiang, A novel human zinc finger protein ZNF540 interacts with MVP and inhibits transcriptional activities of the ERK signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:288-96.
92. Zhao Y, Zhou L, Liu B, Deng Y, Wang Y, Wang Y, Huang W, Yuan W, Wang Z, Zhu C, Liu M, Wu X, Li Y. ZNF325, a novel human zinc finger protein with a RbA-K-like Rb-binding domain, inhibits AP-1- and SRE-mediated transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:1191-9. .
93. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
94. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:639-48.
95. Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene* 2004;23:8486-96.
96. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15:84-9.

Acknowledgements

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Table I. Clinical and pathological data.

Case	Sex	Age (years)	Ethnicity	Tobacco	Alcohol	Anatomic location	TNM category and clinical stage	NED or Recurrence (months)
T1 (285678)	M	73	C	P	P	Pyriform sinus and hemilarynx	T4N2bM0 IV	Loc/Rec (14)
T2 (287723)	M	66	C	P	P	Glottis and subglottis	T4N0M0 IV	Loc/Rec (10)
T3 (276004)	M	52	C	P	P	Glottis	T3N0M0 III	NED (26)
T4 (279422)	F	58	C	P	P	Larynx	T4N0M0 IV	Loc/Rec (7)
T5 (288106)	M	44	C	P	P	Pyriform sinus	T4N2bM0 IV	NED (40)
T6 (286453)	M	48	N	P	P	Transglottis	T4N2cM0 IV	Loc/Rec (14)
T7 (284311)	M	53	C	P	P	Transglottis	T2N2M0 III	Loc/Rec (5)
T8 (271901)	M	58	C	P	P	Transglottis	T4N0M0 IV	NED (30)
T9 (289145)	M	72	N	P	P	Transglottis	T3N0M0 III	NED (38)
T10 (292091)	M	72	C	P	P	Vocal cords	T4N2cM0 IV	Loc/Rec (10)
T11 (288931)	M	44	C	P	N	Vallecula, Epiglottis	T4N2cM0 IV	NED (42)
T12 (288253)	M	60	C	P	P	Pyriform sinus	T4N2cM0 IV	Loc/Rec (7)
T13 (291715)	M	52	C	P	P	Vallecula	T4N1M0 IV	Loc/Rec (4)
T14 (278657)	M	67	C	P	P	Vallecula	T4N1M0 IV	*
T15 (292191)	M	61	C	P	P	Epiglottis, vocal cords	T4N0M0 IV	NED (30)

M = male; F = female; C = caucasian; N = negroid

P = positive; N = negative

NED = Not Evidence of Disease; Loc/Rec = locoregional recurrence

* = not evaluated

Table II. Primer sequences used for validation by quantitative real time PCR.

Gene	Primers: forward (F) and reverse (R)	Target size
ADCY6	F - 5' – ACACCTGCTGACATCACTGC - 3' R - 5' – GACAGAGCTGGCCAAGAGAC – 3'	150
AES	F - 5' – CCCAGCAACTCAAATTCACC - 3' R - 5' – CTCCTGGCCAAGTTGTCAC - 3'	116
ALS2CR3	F - 5' – TTGCCTTCGAGGTTTTATGC - 3' R - 5' – ATGGTTCCCAAGTTTGGTTG - 3'	108
Alfa-tubulin (endogenous control)	F – 5' – TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG - 3' R - 5' – AGTGCCAGTGCGAACTTCATC - 3'	150 pb
CLK1	F - 5' – AGGAGCATTTAGCAATGATG – 3' R - 5' – CCAGTCTAATCGATCGTGGTG - 3'	104 pb
CRR9	F - 5' – TGGGTGCTGAGAACAACATC – 3' R - 5' – ACAGCGTCCCATTGTTTCTC - 3'	120 pb
CSTB	F - 5' – TGTCATTCAAGAGCCAGGTG – 3' R - 5' – GGGAGAGATTGGAACACTCG - 3'	100 pb
DUSP1	F - 5' – GCGGAATCTGGGTGCAGTT - 3' R - 5' – CAGGTACAGAAAGGGCAGGATTT - 3'	81 pb
IL18BP	F - 5' – TAAGCAGTGTCCAGCATTGG – 3' R - 5' – AGGCCACACAGGATAAGCTC - 3'	83 pb
MAP3K5	F - 5' – ACCGAAGAGAAGGGGAGAAG – 3' R - 5' – CCGACCTGCGTAGACTATCC - 3'	135 pb
PLAT	F - 5' – GAGTGCACCAACTGGAACAG – 3' R - 5' – GGCTTTGAGTCTCGATCTGG - 3'	125 pb
PTPRS	F - 5' – TCCTGCGAGAGTTCAAGGTC - 3' R - 5' – GACTTTGGCACACCCTGTTC - 3'	100 pb
UBL1	F - 5' – TGACAACACATCTCAAGAACTCAAA - 3' R - 5' – TCTCTGACCCTCAAAGAGAAACCT - 3'	92 pb
XRCC5	F - 5' – ACCAAAGAGGAAGCCTCTGG – 3' R - 5' – CGTCCACATCACCACCTTC - 3'	121 pb
ZNF706	F - 5' – AAATGCCAAAAAGCAAGCTG – 3' R - 5' – TGCTTGCTCTCAAAGTGCTG - 3'	147 pb

Figure 1. Supervised hierarchical clustering of 8 larynx tumors and 4 normal samples used in the training set. A total of 35 differentially expressed genes were identified using as cutoffs a Signal-to-Noise ratio $> |1|$ and $p \leq 0.001$). Selected transcripts were grouped using hierarchical clustering (UPGMA with Euclidean distance), and heat maps were constructed using software (Spotfire Decision Site; Spotfire, Somerville, MA, USA). For each gene (lines), red indicates higher expression and green lower expression, relative to the average intensity of that gene across all samples (columns).

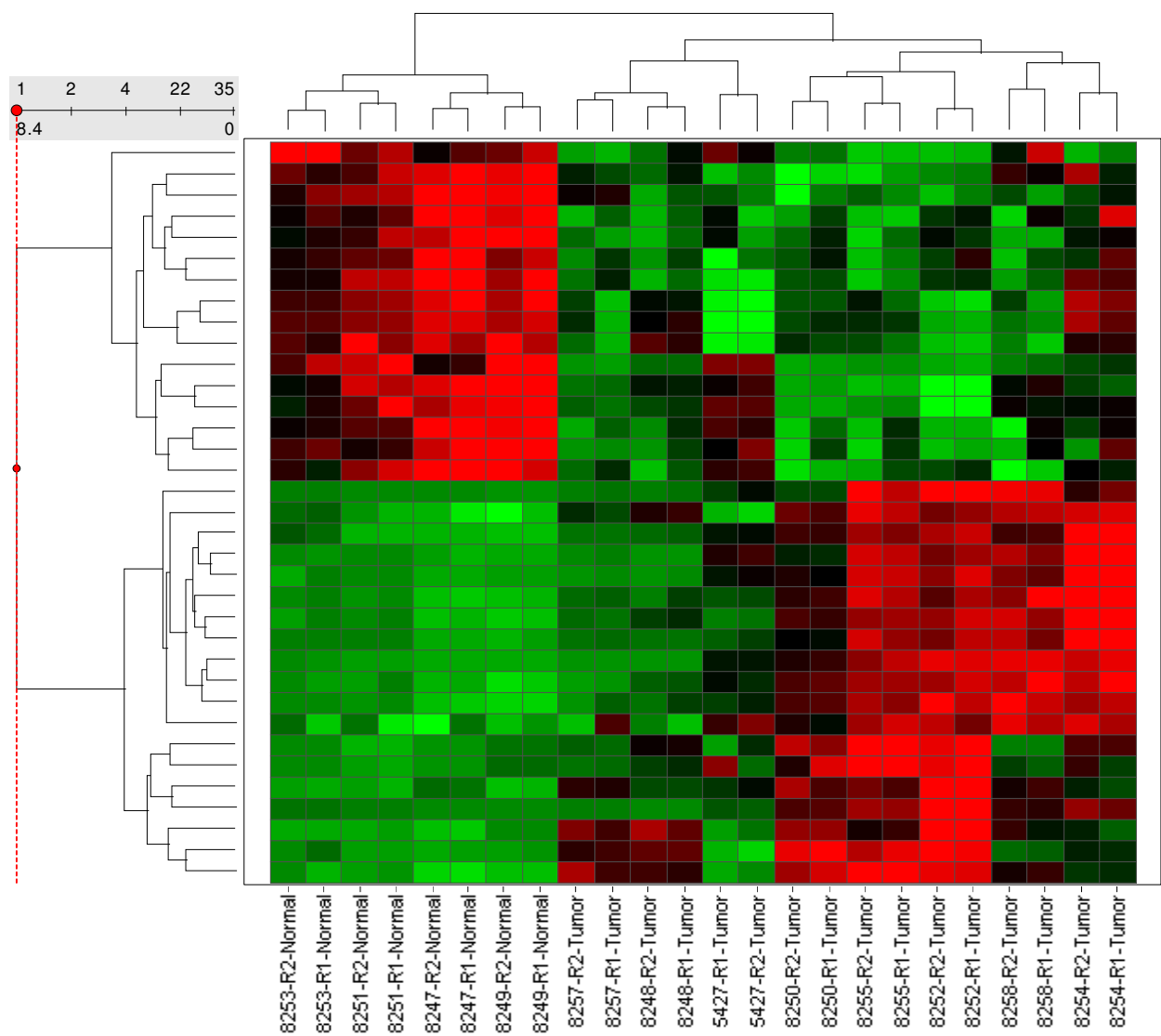


Figure 2. Genes underexpressed in tumor samples and overexpressed in normal samples. For each gene (lines), red indicates higher expression and green lower expression, relative to the average intensity of that gene across all samples (columns).

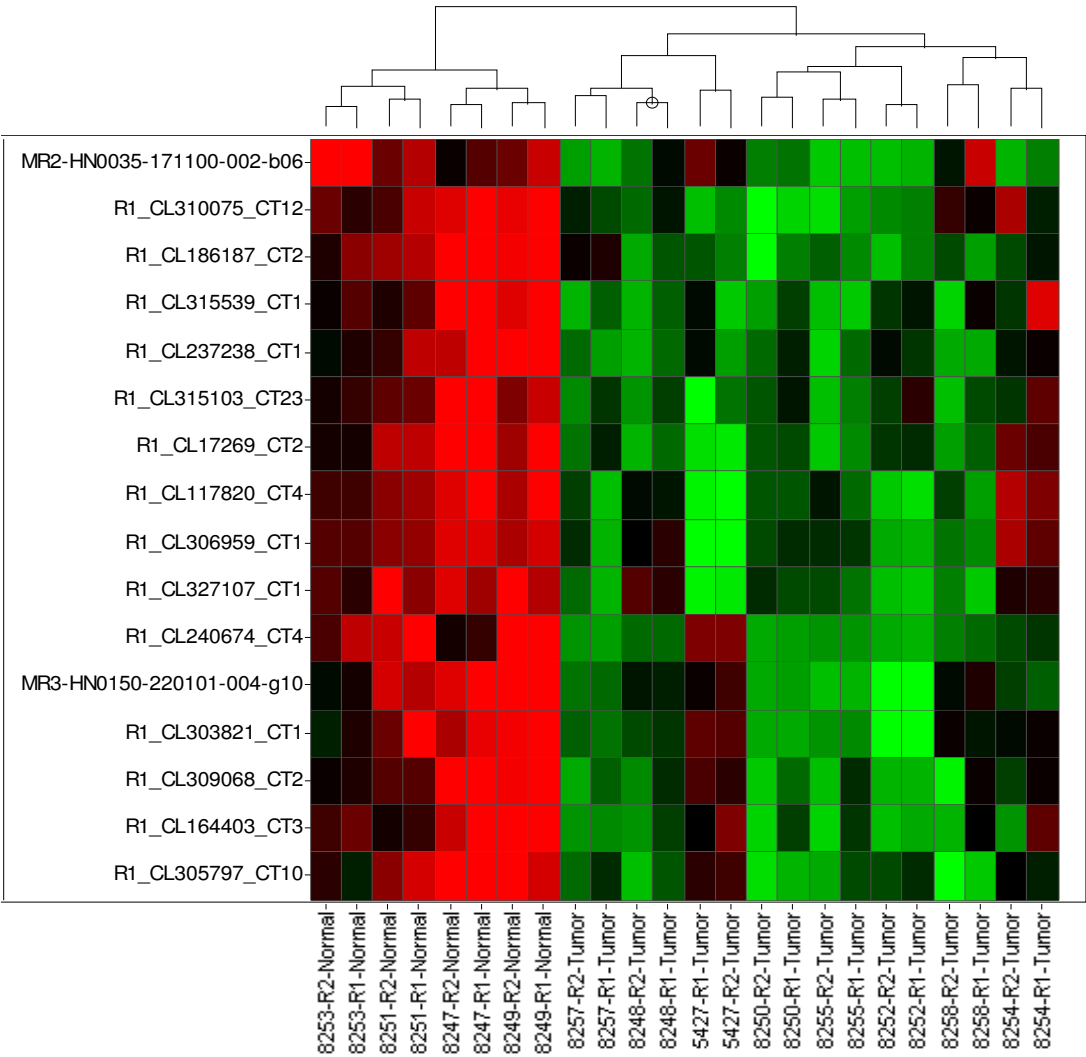


Figure 3. Genes overexpressed in tumor samples and underexpressed in normal samples. For each gene (lines), red indicates higher expression and green lower expression, relative to the average intensity of that gene across all samples (columns).

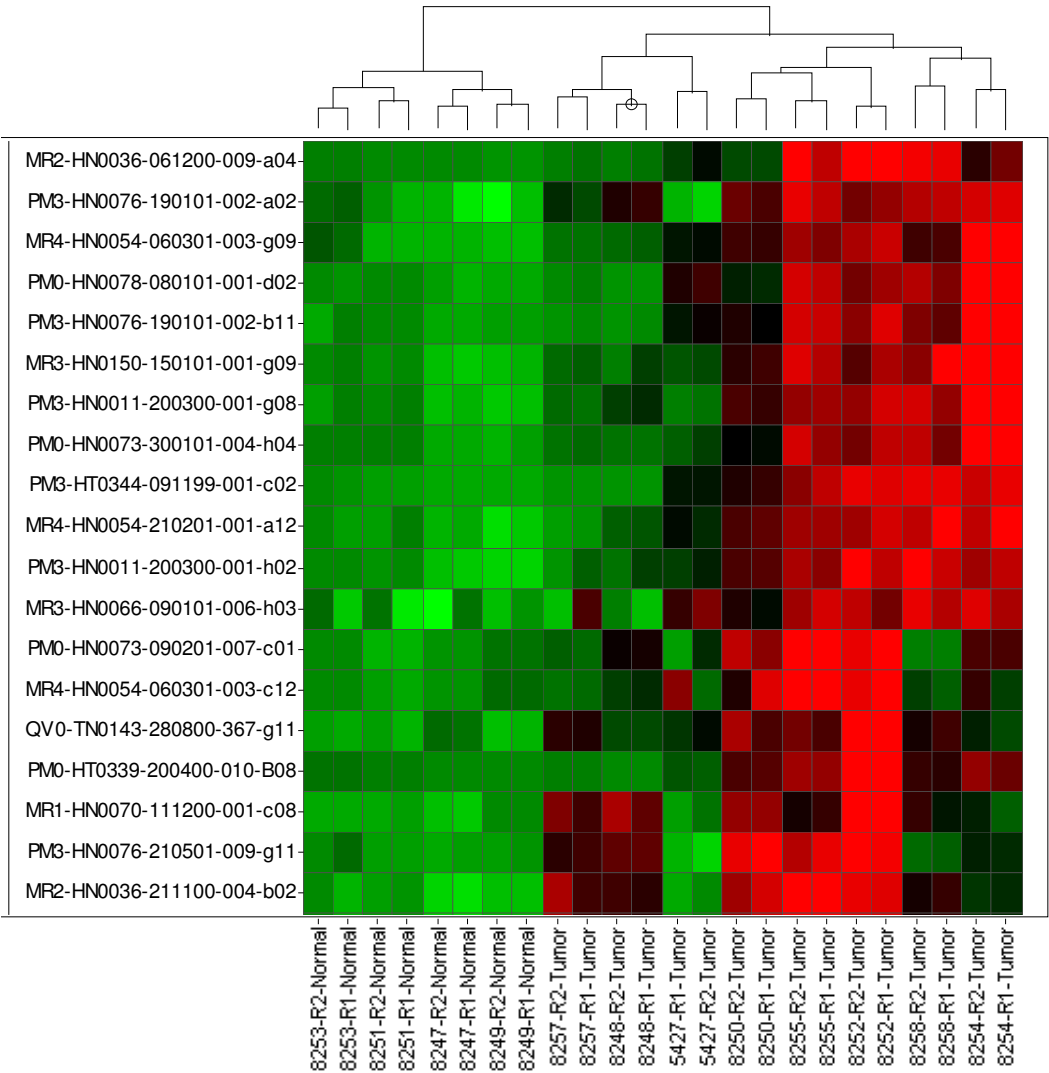


Figure 4. Validation the 35-gene classifier on an independent set of tumor and non-tumor larynx samples. Expression profiles of the 35 genes identified in the training set on the 5 tumor samples and 6 normal samples of the validation set. The metric used was Euclidean distance. To visualize the data, genes and samples were grouped using Spotfire and graphically represented in Treeview. Red indicates higher expression and green lower expression, relative to the average intensity of that gene across all samples.

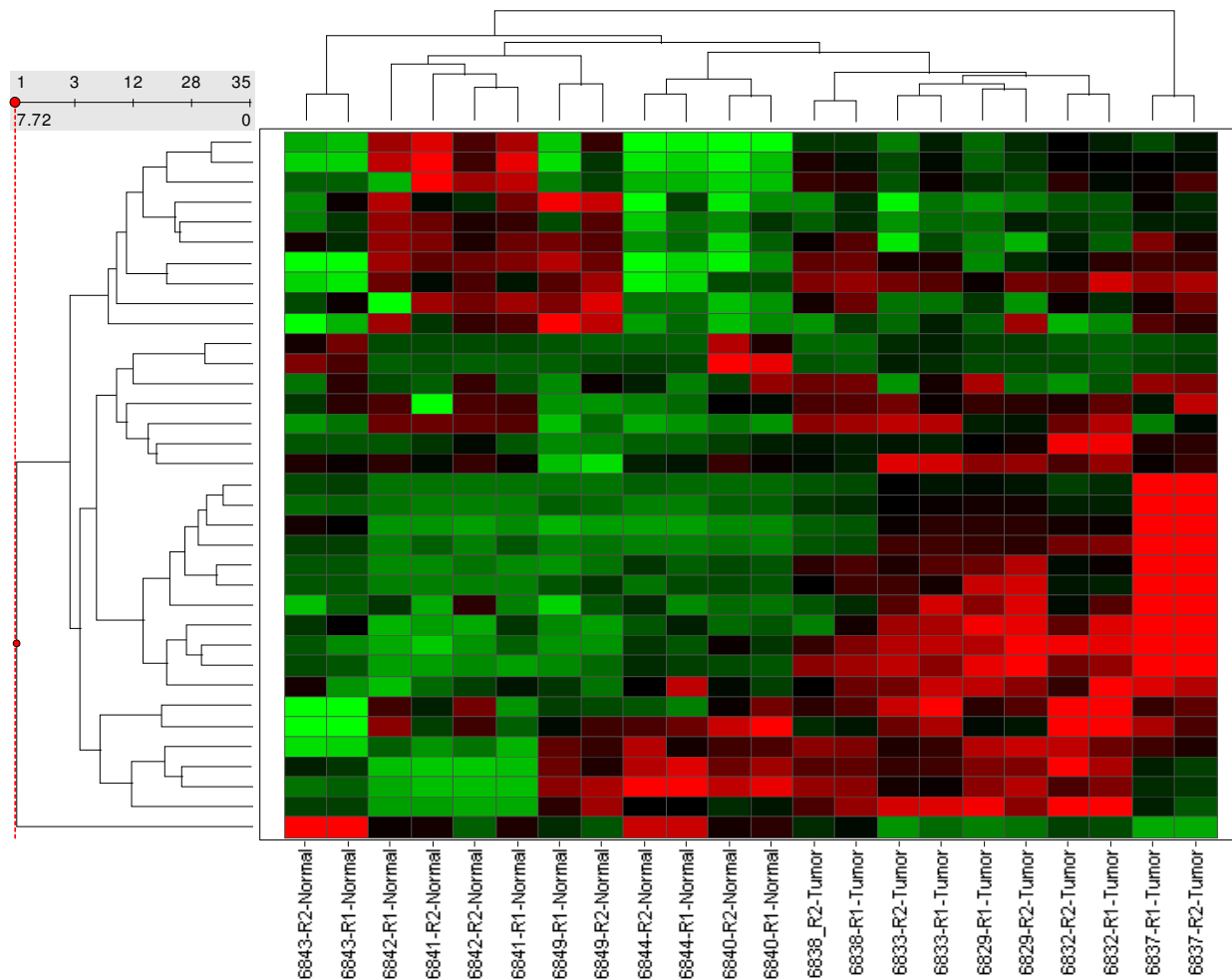


Table III. The 35 genes that showed down-regulation or up-regulation in the larynx cancer.

Description	Genome Mapping	Loss or gain in head and neck cancer according to Knuutila <i>et al.</i> ⁴²	HN Cluster	Reference sequence	Function/Process	Signal-to-Noise Ratio (SNR)
Adenylate cyclase 6 isoform a (ADCY6)	12q14.1	Loss	R1_CL17269_CT2	NM_015270.2	Adenylate cyclase activity/ cAMP biosynthesis	-1.26
Amino-terminal enhancer of split isoform b (AES)	19p13.3	Loss	R1_CL309068_CT2	NM_198969.1	Transcription corepressor activity/ Transcription regulation	-1.12
Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 (ALS2CR3)	2q33.1	Gain	R1_CL303821_CT1	NM_015049.1	GABA receptor binding/ Neurotransmitter transport	-1.05
CDC-like kinase 1 (CLK1)	2q33.1	Gain	R1_CL306959_CT1	NM_004071.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Cell proliferation	-1.18
Cisplatin resistance related protein (CRR9)	5pter15.33	Gain	R1_CL315539_CT1	NM_030782.2	Unknown/ Unknown	-1.05
Cystatin B (CSTB)	21q22.3	Loss	R1_CL240674_CT4	NM_001000.2	Cysteine protease inhibitor activity/ Protease inhibition	-1.28
Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1)	5q35.1	Loss	R1_CL117820_CT4	NM_004417.2	MAP kinase phosphatase activity/ Cell cycle	-1.21
Interleukin 18 binding protein precursor (IL18BP)	11q13.4	Gain	R1_CL305797_CT10	NM_001039659.1	Receptor antagonist activity/ T-helper 1 type immune response	-1.21
Mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP3K5)	6q25.1	Loss	R1_CL237238_CT1	NM_005923.3	MAP kinase kinase kinase activity/ Apoptosis	-1.14

Plasminogen activator tissue type isoform 2 (PLAT)	8p11.21	Loss	R1_CL186187_CT2	NM_000930.2	Plasminogen activator activity/ Proteolysis	-1.24
Protein tyrosine phosphatase receptor type (PTPRS)	19p13.3	Loss	R1_CL310075_CT12	NM_002850.3	Protein tyrosine phosphatase activity/ Cell adhesion	-1.00
Protein zinc finger 706 (ZNF706)	8q22.3	Gain	R1_CL164403_CT3	NM_016096.3	Nucleic acid binding/ Unknown	-1.12
Ubiquitin-like 1 (sentrin) (UBL1)	2q33.1	Gain	R1_CL327107_CT1	NM_001005781.1	SUMO conjugating enzyme activity/ DNA Repair	-1.27
X-ray repair defective repair in Chinese hamster cells (XRCC5)	2q35	Loss	R1_CL315103_CT23	NM_021141.2	ATP-dependent DNA helicase activity/ DNA repair	-1.06
Homo sapiens chromosome 11 genomic contig	11q13.4	Gain	MR2-HN0035-171100-002-b06	NT_033927.7	Unknown/ Unknown	-1.02
Homo sapiens chromosome 2 genomic contig	2q31.2	Gain	MR3-HN0150-220101-004-g10	NT_005403.16	Unknown/ Unknown	-1.27
Adenosine monophosphate deaminase 1 (AMPD1)	1p13	Loss	MR2-HN0036-061200-009-a04	NM_000036.1	Hydrolase activity/ Metabolism	1.11
Cryptochrome 2 (photolyase-like) (CRY2)	11p11.2	Loss	MR4-HN0054-060301-003-c12	NM_021117.2	Nucleotide and protein binding/ Transcription regulation	1.01
Dedicator of cytokinesis 1 (DOCK1)	10q26.2	Loss	MR1-HN0070-111200-001-c08	NM_001380.3	GTPase activator activity/ Apoptosis	1.30
Enhancer of mRNA decapping 4 (EDC4)	16q22.1	Loss	MR4-HN0054-060301-003-g09	NM_014329.3	Protein binding/ Unknown	1.18

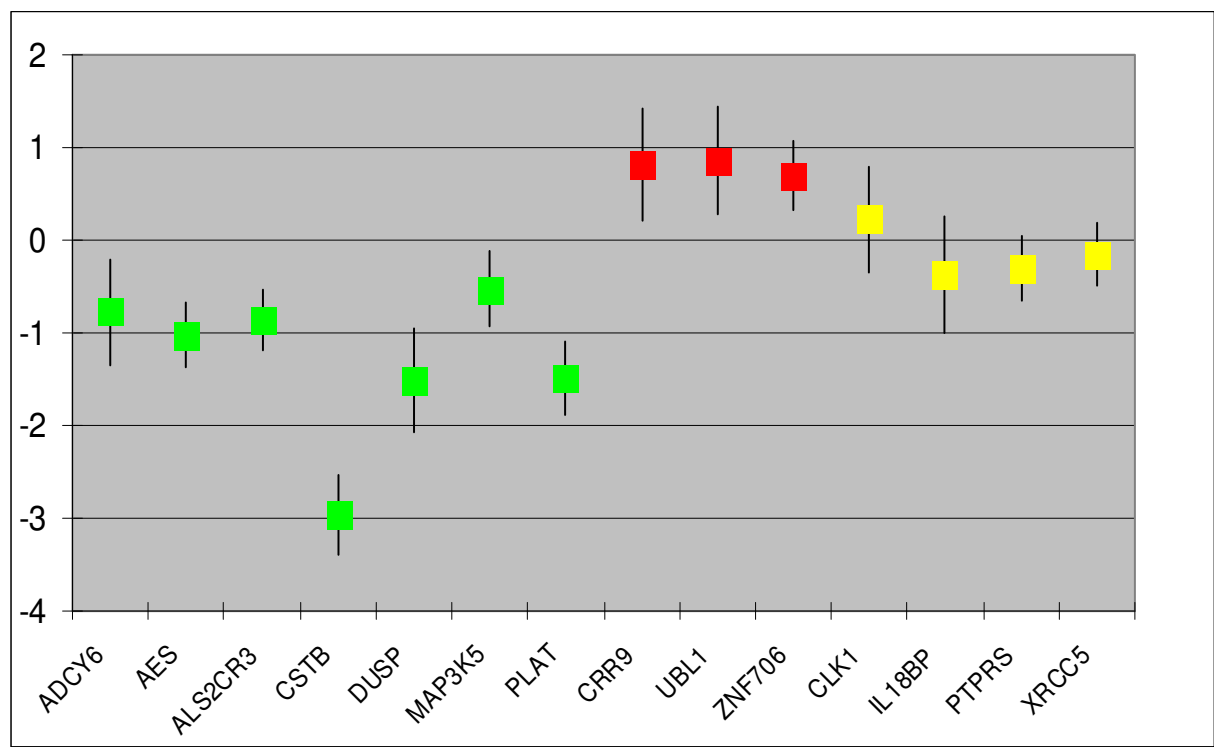
Family with sequence similarity 134, member C (FAM134C)	17q21.31	Gain	QV0-TN0143-280800-367-g11	NM_178126.2	Unknown/Unknown	1.10
Homo sapiens chromosome 1 genomic contig	1p33	Loss	PM3-HN0011-200300-001-h02	NT_032977.8	Unknown/Unknown	1.33
Homo sapiens chromosome 10 genomic contig	10p12.2		PM3-HT0344-091199-001-c02	NT_008705.15	Unknown/Unknown	1.35
Homo sapiens chromosome 19 genomic contig	19p13.2	Loss	PM0-HN0078-080101-001-d02	NT_011295.10	Unknown/Unknown	1.25
Homo sapiens chromosome 6 genomic contig	6q14.1	Loss	PM3-HN0011-200300-001-g08	NT_007299.12	Unknown/Unknown	1.25
HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog (HSCB)	22q12.1	Loss	PM0-HN0073-090201-007-c01	NM_172002.3	Chaperone binding/ Folding protein	1.08
Hypothetical protein LOC56204 (KIAA1370)	15q21.2	Gain	PM3-HN0076-190101-002-a02	NM_019600.1	Unknown/Unknown	1.02
Myosin binding protein C fast type (MYBPC2)	19q13.33	Loss	MR2-HN0036-211100-004-b02	NM_004533.3	Actin binding/ Cell adhesion	1.55
Paired box gene 8 (PAX 8)	2q13	Loss	MR4-HN0054-210201-001-a12	NM_003466.3	Transcriptional activator activity/Transcription regulation	1.27
<u>Phosducin isoform a</u> (PDC)	1q25.2	Gain	PM3-HN0076-210501-009-g11	NM_002597.3	Phospholipase inhibitor activity/ Response to stimulus	1.23
Rho GTPase activating protein 26 (ARHGAP26)	5q31	Loss	PM3-HN0076-190101-002-b11	NM_015071.3	Rho GTPase activator activity/Signal Transduction	1.22

Rho GTPase activating protein 27 (ARHGAP27)	5q31	Loss	MR3-HN0150-150101-001-g09	NM_199282.1	Rac GTPase activator activity/Signal transduction	1.22
SET domain containing 1A (SETD1A)	16p11.2	Loss	MR3-HN0066-090101-006-h03	NM_014712.1	Nucleotide and protein binding/Chromatin modification	1.03
Ubiquitin specific peptidase 54 (USP54)	10q22.2	Loss	PM0-HT0339-200400-010-b08	NM_152586.3	Ubiquitin thiolesterase activity/ubiquitin-dependent protein catabolism	1.03
XK-related protein 6 isoform b (XKR6)	8p23.1	Loss	PM0-HN0073-300101-004-h04	NM_173683.3	Unknown/Unknown	1.22

Table IV. Natural logarithms of relative expression levels detected by quantitative real-time PCR for the 14 genes in samples from larynx carcinoma

Sample	Gene													
	ADCY6	AES	AL2SCR3	CLK1	CRR9	CSTB	DUSP1	IL18BP	MAP3K5	PLAT	PTPRS	UBL1	XRCC5	ZNF706
T1	-0.58224	-1.63814	-0.93344	-0.18484	1.069757	-3.55585	-3.86314	0.146716	-0.46325	-1.105589	0.976182	1.238423	-0.3304	0.083178
T2	-0.14094	-1.57113	-0.33964	0.369678	2.201898	-2.61316	-0.99582	-1.37821	0.127077	-2.27583	0.181374	1.379363	0.579933	1.085931
T3	0.23567	-0.39509	-0.20101	1.617343	1.795251	-2.65013	-1.2777	-0.2969	0.429751	-1.41402	0.474806	1.55265	0.161734	1.481024
T4	-1.96392	-1.81605	-1.28232	1.072068	1.203766	-2.59006	-2.14182	-1.61619	-0.76708	-1.32622	-0.62499	2.496485	-1.59424	1.472938
T5	-3.26472	-1.73518	-0.93575	0.778635	0.064694	-2.91584	-1.02124	-1.67973	-0.90571	-2.80263	-1.29965	1.578065	0.062383	-0.55683
T6	-0.72087	-0.84795	-0.14787	1.321601	1.379363	-1.99164	-0.35582	0.423975	-0.87337	-1.84377	-0.30845	1.051273	0.14325	0.838708
T7	-1.85532	-0.19639	-1.85301	1.765215	2.710205	-4.4708	-0.26571	-1.11943	-1.9824	-2.46991	-1.14023	1.809114	0.124766	0.298053
T8	0.019639	-0.92189	-0.67697	0.89416	1.201455	-2.73562	-2.43295	-0.7151	-0.36621	-1.06976	-0.25993	2.151067	0.390473	0.963475
T9	-1.21301	-0.81329	-1.2546	-1.30312	-0.26802	-1.62039	-2.4237	-0.72318	-0.43206	-1.58731	-0.25415	-1.04665	-0.21025	0.56376
T10	0.75553	-0.76477	-0.84564	-0.51986	0.344263	-2.75247	-0.36968	1.099794	-0.07625	-1.40247	0.198702	0.198702	-0.90109	0.300364
T11	-0.65849	-1.18759	-0.75784	-0.65387	0.050831	-2.86039	-1.82529	-2.01359	-0.94961	-1.88998	-0.20794	-0.19408	-0.30961	0.887228
T12	-1.52723	-1.94543	-1.90847	-0.98658	-1.26846	-4.04336	-2.43988	-0.64578	-0.93806	-0.73936	-0.23336	0.445925	0.101662	1.799872
T13	-0.12246	0.304985	0.237981	0.75322	1.755973	-2.34977	-0.59149	0.957698	0.496755	-0.61228	-0.59611	1.136761	0.538344	-0.31885
T14	-0.4182	-0.92882	-1.22456	-1.09517	-0.42975	-3.77534	-1.67048	0.019639	-1.52954	-1.55265	-1.17373	-0.60766	-0.94961	0.6608
T15	-0.11552	-0.89878	-0.76477	-0.42282	0.46903	-3.53043	-1.13907	1.918862	0.374299	-0.23567	-0.22181	-0.25184	-0.09704	0.903402
Mean±SD	-0.77147± 1.03427	-1.0237± 0.638628	-0.85919± 0.595665	0.227044± 1.026294	0.818684± 1.088795	-2.96368± 0.772948	-1.52092± 1.011732	-0.37476± 1.136535	-0.52371± 0.718999	-1.48518± 0.70262	-0.29929± 0.620724	0.862506± 1.052635	-0.15265± 0.59878	0.697537± 0.658494
P value	0.012	0.000	0.000	0.406	0.011	0.000	0.000	0.222	0.014	0.000	0.083	0.007	0.340	0.001

Figure 5. Mean and 95% confidence interval for the natural logarithms of the values of relative expression of the selected genes for validation by quantitative real time RT-PCR. Expression of *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5* and *PLAT* genes were significantly lower in tumor tissues than in normal reference. Expression of *CRR9*, *UBL1* and *ZNF7063* genes were significantly higher in tumor tissues than in normal reference. *CLK1*, *IL18BP*, *PTPRS* and *XRCC5* genes did not show differentially expressed.



III - DISCUSSÃO

III – DISCUSSÃO

A. Aspectos epidemiológicos do câncer de laringe

O câncer de cabeça e pescoço é o quinto tipo mais comum de neoplasia no mundo, com uma incidência anual estimada de 780.000 novos casos (Lothaire et al., 2006). Dentro desse grupo, a incidência de tumores de laringe é uma das mais altas, correspondendo a 25% de todos os casos e 2% de todas as doenças malignas (INCA, 2007). Aproximadamente 2/3 dos tumores de laringe ocorrem na prega vocal verdadeira e 1/3 acomete a laringe supraglótica, ou seja, localizam-se acima das cordas vocais. Essa neoplasia apresenta prognóstico reservado e alto índice de mortalidade (Vokes & Stenson, 2003).

Os dados epidemiológicos indicam que o consumo combinado de álcool e fumo constitui o principal fator etiológico para o seu desenvolvimento, embora outros fatores como a nutrição, a má dentição, a ocupação profissional, a infecção por HPV, principalmente os tipos 16 e 18, a predisposição e a suscetibilidade genética podem contribuir para o seu desenvolvimento (Goldenberg et al., 2001; Döbrossy et al., 2005; Syrjänen et al., 2005; Ragin et al., 2007).

No presente trabalho, obteve-se informações sobre sexo, idade, tabagismo, etilismo e estadiamento clínico nos indivíduos com câncer de laringe pertencentes ao grupo de estudo.

A grande maioria dos indivíduos (93,33%) era do sexo masculino. Conforme a literatura, o câncer de laringe afeta predominantemente homens (Vokes & Stenson, 2003). Uma possível explicação é que os homens apresentam uma maior exposição aos fatores de risco como o tabagismo e o etilismo, além disso, as mulheres se mostram mais preocupadas com a saúde realizando exames periodicamente.

A média de idade dos pacientes com tumor de laringe foi cerca de 58 anos, sendo que a faixa etária entre 50 a 60 anos a que apresentou maior número de indivíduos. Esses dados estão de acordo com a literatura, que indica uma frequência baixa de câncer de cabeça e pescoço abaixo dos 40 anos, mas aumentando progressivamente com a idade, sendo a idade média de apresentação da doença por volta dos 64 anos (Gilroy et al., 2005).

Todos os pacientes, exceto um, eram simultaneamente tabagistas e etilistas. A participação desses fatores de risco na carcinogênese de cabeça e pescoço é bastante clara, com vários trabalhos na literatura apoiando essa associação (Scully et al 2000a; Hunter et al., 2005).

O tabaco consiste em uma complexa mistura de mais de 4.000 substâncias, das quais pelo menos 50 são carcinogênicas, entre elas, destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), as nitrosaminas, os aldeídos e as aminas aromáticas que podem formar adutos de DNA após sua ativação metabólica e induzir muitos tipos de mutações (Canevari & Rogatto, 2004).

Em relação ao álcool, os possíveis mecanismos pelos quais seu consumo pode aumentar o risco de câncer incluem a carcinogenicidade do acetaldeído, um metabólito do álcool, que forma adutos de proteínas, resultando na produção de anticorpos, inativação de enzimas e prejuízos no sistema de reparo do DNA. O álcool pode agir também como um solvente e facilitar a penetração de carcinógenos nos tecidos-alvos. Além disso, aumenta o índice de quebras no material genético e a peroxidação de lipídios e conseqüentemente a produção de radicais livres (Greenwald et al., 2001; Canevari & Rogatto, 2004; Hunter et al., 2005).

A exposição a estes fatores parece atuar sinergisticamente, sendo o risco de câncer, associado com a exposição combinada de álcool e fumo, mais pronunciado na parte superior da laringe quando comparada à parte inferior (Licitra et al., 2003).

Com relação aos dados histopatológicos, a grande maioria dos pacientes (93,33%) tinham tumores T3-T4 e 60% tinham metástase regional, embora metástase a distância não foi observada em nenhum caso. Em relação ao estágio clínico, 3 pacientes tinham estágio III e 12 tinham estágio IV, dessa forma, todos os pacientes apresentavam estágio clínico avançado. Enquanto 6 pacientes estavam sem evidência de doença no ultimo follow-up, 8 pacientes apresentaram doença recorrente. A recorrência ocorreu entre 4 e 14 meses após a cirurgia. Os dados observados estão de acordo com a literatura, pois cerca de 40 a 50% dos pacientes com estágio clínico avançado, ou seja estágios III e IV, apresentam doença recorrente e aproximadamente 80% das recorrências ocorrem nos dois primeiros anos (Chung et al., 2004).

B. Análise de expressão gênica em câncer de laringe pelas técnicas de microarray e RT-PCR em tempo real

A avaliação do prognóstico em carcinoma de cabeça e pescoço tem sido feita baseada em fatores clínicos e patológicos, como o estágio do tumor, o envolvimento de linfonodos, a margem pós-cirúrgica e o grau histológico. Contudo, esses parâmetros clínicos e patológicos não apresentam sensibilidade e acurácia suficientes para serem biomarcadores de prognóstico (Choi & Chen, 2005; Thomas et al., 2005; Chung et al., 2006; Lothaire et al., 2006).

Avanços no conhecimento da patogênese e progressão do HNSCC têm estimulado o desenvolvimento de novos biomarcadores com potencial de aplicações clínicas, que pode beneficiar, por exemplo, pacientes que necessitem de modalidades de tratamento mais agressivas (Chung et al., 2006).

Estudos recentes têm focado na definição de alterações moleculares específicas do tumor que possam constituir biomarcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico. Estes estudos têm revelado numerosas alterações moleculares, incluindo a ativação de oncogenes, como *EGFR* (Kalyankrishna et al., 2006), *PRADI-ciclina D1* (Angandi & Krishnapillai, 2007); a inativação de genes supressores de tumor, como *TP53* (Keum et al., 2006), *P16* (Smith et al., 2007) e *P27* (Hirai et al., 2007); e a expressão de fatores angiogênicos (Onesto et al., 2006) e de invasão celular (Liu et al., 2005; Rosenthal & Matrisian, 2006).

Contudo, a maioria dessas alterações tem mostrado, isoladamente, insuficiente poder preditivo. Vários fatores podem contribuir para a falta de poder preditivo dos biomarcadores em HNSCC e a discordância entre os estudos. Esses fatores incluem as variações na localização do tumor primário, pois a grande maioria dos estudos moleculares é realizada em amostras de pacientes com HNSCC sem distinção entre os diferentes sítios anatômicos; a sensibilidade das técnicas utilizadas; a qualidade dos espécimes estudados; bem como a falta de técnicas diretas para medir atividade funcional enzimática. Outro ponto extremamente importante é quanto às diferenças nos protocolos de tratamento dos pacientes, as quais podem levar a diferenças nos índices de sobrevivência (Thomas et al., 2006).

No entanto, um ponto que merece destaque é a heterogeneidade genética intrínseca da doença, a qual é um resultado direto do acúmulo de mutações e mudanças epigenéticas, como perda de heterozigotidade, inativação gênica por metilação e amplificação gênica. Esses eventos podem alterar os programas transcricionais e/ou as funções das proteínas (Jeon et al., 2004).

Análise do transcriptoma, que é o conjunto de genes expressos em uma célula ou tecido, é uma importante ferramenta para revelar alguns desses mecanismos moleculares e dessa forma contribuir pra a identificação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico

precoce, prognóstico, bem como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Reis et al., 2005).

A técnica de *microarray* é extremamente importante para o estudo da expressão gênica diferencial em câncer, pois permite a identificação simultânea de genes com expressão alterada em tecido tumoral, os quais podem ser usados como biomarcadores de prognóstico e diagnóstico para cada tipo de tumor e também como candidatos para alvos terapêuticos (Phan et al., 2004; Somoza-Martin et al., 2005).

No entanto, embora a tecnologia de *microarray* represente uma ótima oportunidade para a pesquisa clínica por monitorar mudanças globais, questões significativas precisam ser consideradas. (Russo et al., 2002).

A qualidade e quantidade do RNA permanecem como um grande desafio nos experimentos. O RNA é uma molécula extremamente instável, assim, o rápido processamento para manter a integridade do RNA é crucial, pois dados falsos podem ser gerados a partir de RNA degradado. Dessa forma, após a retirada cirúrgica, as amostras devem ser imediatamente mantidas em temperatura extremamente baixa (-80°C) para evitar a degradação do RNA (Huang et al. 2001; Choi & Chen, 2005).

Além disso, as amostras de tecido tumoral humano são uma mistura de diferentes tipos celulares, como células neoplásicas, estromais, inflamatórias, endoteliais e normais. Dessa forma, mudanças nos modelos de expressão gênica, quando comparam-se duas diferentes amostras, são a manifestação de todos os tipos celulares presentes nas amostras, o que pode, segundo alguns autores, ocasionar análises inadequadas. Métodos como microdissecção a laser, a qual permite o isolamento de células específicas, podem ser muito úteis, mas ainda são tecnologicamente limitados (Irié et al., 2004). No entanto, outros autores referem a importância da interação entre as células neoplásicas e seu estroma circunvizinho ou células não tumorais, pois a biologia do tumor é o resultado da interação desses vários

tipos celulares e dessa forma, é relevante sua presença nas amostras sob investigação (Brentani et al., 2005).

O reduzido tamanho de muitas amostras clínicas é outro problema crítico, devido a pouca quantidade de RNA obtida, especialmente nos casos em que as amostras foram microdissecadas a laser. Uma solução para esse problema é amplificação de RNA, técnica que já está sendo utilizada (Zhao et al., 2002).

Alguns trabalhos têm usado linhagens celulares, no entanto, este fato também tem levantado alguns debates. O uso de linhagens celulares torna os experimentos mais reprodutíveis, no entanto, estas células estão fora de um contexto biológico que é relevante e também acumulam mutações em seu genoma, o que torna difícil extrapolar os resultados para um modelo real (Brentani et al., 2005)

Contudo, é bastante provável que a principal fonte de heterogeneidade entre os diferentes estudos de *microarray* seja os diferentes métodos de geração e análise dos dados, pois há diferentes tipos de plataformas, diferentes grupos de genes são incluídos em cada uma delas e diferentes técnicas são usadas para hibridização. Dessa forma, vários métodos de análise estatística estão sendo desenvolvidos para transpor o viés sistemático das variações experimentais. Um exemplo é o uso da *distance weighted discrimination* (DWD) para superar e corrigir viés introduzido pela variação técnica no *array*. Isto permite que *chips* de diferentes instituições, diferenças nas plataformas e variações experimentais sejam corrigidas para a comparação de dados (Benito et al., 2004).

Outro ponto importante é quanto a validação dos resultados obtidos, pois os genes identificados como diferencialmente expressos pela técnica de *microarray* precisam ter sua expressão diferencial confirmada. No entanto, muitos trabalhos não realizaram tais validações, o que contribui para a heterogeneidade dos resultados. As técnicas que podem ser utilizadas para as validações dos dados gerados por *microarray* incluem, por exemplo, imuno-

histoquímica, *tissue array* e PCR em tempo real (Chen et al., 2003b; Rijn & Gilks, 2004). Essa última tem recentemente alcançado um nível de sensibilidade, acurácia e praticidade que suporta seu uso como um bioinstrumento de rotina para quantificação de expressão gênica, sendo atualmente considerada o método mais apropriado para confirmar os dados gerados por *microarray* (Provenzano & Mocellin, 2007).

Diante do exposto, pode-se perceber que há muito a validar, antes que a técnica tenha plena utilidade clínica, contudo, a expectativa é que a análise da expressão gênica em larga escala permita uma classificação molecular detalhada dos tumores, a qual possa predizer seu comportamento clínico e fornecer subsídios para uma melhor classificação dos pacientes e para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. (Ring & Ross, 2002).

Dessa forma, vários trabalhos na literatura investigaram o perfil de expressão gênica em tumores de cabeça e pescoço, os quais encontraram alterações na expressão de genes envolvidos em diversos mecanismos celulares como controle do crescimento e diferenciação celular, angiogênese, apoptose, adesão e motilidade celular, remodelação tecidual, ciclo celular, sinalização, regulação da transcrição e sistema imune (Alevizos et al., 2001; Al-Moustafa et al., 2002; Belbin et al., 2002; El-Naggar et al. 2002; Gonzalez et al, 2003; Há et al., 2003; Nagata et al. 2003; Chung et al, 2004; Ginos et al., 2004; Iriê et al., 2004; Jeon et al., 2004; Kuriakose et al., 2004; Sotiriou et al., 2004; Warner et al., 2004; Belbin et al., 2005; Somoza-Martín et al., 2005; Roepman et al., 2005; Dysvik et al., 2006; Kainuma et al., 2006; Tomioka et al., 2006).

Estes estudos produziram listas muito variáveis de genes candidatos envolvidos no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Isto se deve, em parte, a alguns dos motivos já mencionados, como uso de pequeno número de amostras tumorais e normais, uso de linhagens celulares instáveis, análise estatística limitada ou falta de validação dos genes selecionados. (Kuriakose et al., 2005). No entanto, essas divergências

também podem representar diferenças verdadeiras na biologia dos tumores, baseadas em seus diferentes subsítios e também em outros fatores que não são considerados como, por exemplo, infecção pr HPV, como também a heterogeneidade intrínseca da doença (Chung et al., 2006).

O presente trabalho investigou a expressão gênica diferencial de 340 seqüências gênicas, previamente identificadas pelo *Head and Neck Annotation Consortium* (Reis et al., 2005), pela técnica de *microarray*.

As análises de bioinformática deste trabalho foram executadas no Laboratório de Expressão Gênica de Eucariotos do Instituto de Química da USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis. Dessa forma, dentre as 340 seqüências gênicas estudadas, 35 (10,29%) mostraram-se diferencialmente expressas entre tecido tumoral e normal de laringe pela técnica de *microarray* ($\text{SNR} \geq |1.0|$, $p\text{-value} \leq 0.001$). Os genes diferencialmente expressos estavam envolvidos em processos como apoptose, ciclo celular, reparo de DNA, regulação da transcrição, transdução de sinal, inibição de proteases e proteólise. Esse conjunto de genes diferencialmente expressos permitiu a clusterização hierárquica das amostras, ou seja, a separação das amostras tumorais das amostras normais

Dessas, 35 seqüências diferencialmente expressas, 19 apresentaram-se com alta expressão nos tumores e 16 com baixa expressão, quando comparadas às amostras histologicamente normais de laringe.

Para validar os dados de expressão gênica foi utilizada a técnica de RT-PCR em tempo real. Dessa forma, foram avaliados os perfis de expressão de 14 genes que apresentaram, segundo a técnica de *microarray*, baixa expressão no tumor (*ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CLK1*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *IL18BP*, *MAP3K5*, *PLAT*, *PTPRS*, *UBL1*, *XRCC5*, *ZNF706*). Dessa forma, dos 14 genes selecionados que foram analisados por ambas as técnicas, 7 (50%) mostraram resultados congruentes, ou seja, apresentaram baixa expressão no tumor; 4 (28,57%) não foram validados pela técnica de PCR em tempo real; e 3 (21,42)

exibiram perfis de expressão opostos, ou seja a técnica de PCR em tempo real evidenciou alta expressão desses genes em tecido tumoral.

Alguns autores têm mostrado correlações variadas entre as técnicas de cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real, utilizando as mesmas amostras ou um outro grupo de amostras em ambos os ensaios. Wang et al. (2006) analisaram a expressão gênica de amostras de tecido cerebral, pulmonar e hepático em duas diferentes plataformas de cDNA *microarray* e também PCR em tempo real, utilizando as mesmas amostras em ambos os ensaios. Estes autores avaliaram a expressão de 1.375 genes e encontraram uma correlação perfeita de 34-40% entre os ensaios e anti-correlações de 6,3-9,6% dos genes analisados. Chiu et al. (2005) selecionaram genes encontrados superexpressos em amostras de câncer colon-rectal em relação à mucosa normal correspondente, em ensaios de cDNA *microarray*. Análise de um novo grupo de amostras por ensaios de PCR em tempo real mostrou uma concordância na expressão diferencial de 40% destes genes. Um estudo recente, realizado por Liew & Chow (2006), usando células BHK-27 infectadas por vírus da dengue demonstrou 53% de concordância em seus resultados de expressão gênica avaliada pelas duas técnicas, enquanto que 27% dos genes apresentaram perfis de expressão opostos.

O uso de cDNA *microarray* é uma técnica que permite avaliar a expressão gênica global e o rastreamento do perfil gênico das amostras. No entanto, uma limitação no uso de cDNA *microarrays* consiste na significativa diminuição de acurácia na detecção da expressão gênica diferencial em baixos níveis de expressão e na baixa sensibilidade para detectar pequenas alterações de expressão (Wang et al. 2006). Um outro fator que pode contribuir para uma alta ou baixa correlação entre as técnicas de PCR em tempo real e cDNA *microarray* é a diferença nos desenhos das sondas para o *array* e a PCR. Esta diferença pode resultar na quantificação de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de *splicing*

alternativo ou degradação, alterando medidas absolutas como taxas de falsos positivos e anti-correlação (Hedge et al., 2003) .

Esses dados reforçam a importância e a necessidade de validações dos dados gerados pela técnica de *microarray*, antes que conclusões sobre a expressão de determinados genes possam ser obtidas (Liew & Chow, 2006).

Dessa forma, foi observado que os genes *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP*, *MAP3K5*, *PLAT* e *PTPRS* apresentaram baixa expressão no tecido tumoral em ambos os ensaios. Todos esses genes, exceto *ALS2CR3*, mapeiam em regiões de perda cromossômica envolvidas na carcinogênese de cabeça e pescoço.

O gene *ADCY6*, localizado em 12q14.1, apresentou evidência de baixa expressão ($p\text{-value} = 0,012$) nas amostras tumorais. Este gene codifica a adenilato ciclase 6, que é uma enzima associada à membrana plasmática e cataliza a formação de cAMP, participando da regulação do crescimento celular. Estudos realizados por Celano et al. (2003) mostraram que a expressão de *ADCY6* foi significativamente reduzida em nódulos de tireóide hiperfuncionais quando comparado ao tecido normal peri-nodular, evidenciando baixa expressão desse gene em tecidos alterados.

O gene *AES*, localizado em 19p13.3, apresentou evidência de baixa expressão nas amostras tumorais analisadas ($p\text{-value} = 0,000$). Este gene é um co-repressor do fator transcricional NF-kappa β , o qual atua como ativador de genes que codificam citocinas, quimocinas e moléculas de adesão celular importantes na resposta imune e inflamatória, assim como de genes críticos no controle da proliferação celular e apoptose (Chang & Waes, 2006). O gene *AES* também inibe a expressão de genes dependentes de NF-kappa β e induzidos pelo fator de necrose tumoral alpha, como interleucina 1 beta e proteína quinase regulada por sinal extracelular (Tetsuka et al., 2000).

O gene *NF-kappa β* , por sua vez, modula um amplo programa de genes diferencialmente expressos durante a progressão do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, destacando-se os genes *ciclina D1-PRAD1*, *GST*, *Gro-1*, o qual é homólogo a interleucina 8 (Loercher et al., 2004; Chang & Waes, 2006). Estudos indicam ainda que *NF-kappa β* estimula a expressão de enzimas que atuam na degradação da matriz extra-celular, como as metaloproteinases de matriz, especialmente MMP2 e MMP9, as quais parecem desempenhar um papel importante na carcinogênese de cabeça e pescoço (Bindhu et al., 2006). Em estudo realizado por Andela et al. (2000), a inibição de *NF-kappa β* resultou na baixa expressão de MMP9 e do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (PLAU), o qual está envolvido tanto no processo de angiogênese como no processo metastático.

A inativação do gene *NF-kappa β* tem mostrado inibir algumas características fenotípicas malignas em câncer de cabeça e pescoço, como a proliferação, a sobrevivência celular, a migração e a angiogênese (Loercher et al., 2004). Dessa forma, o gene *AES* pode ter um importante papel na carcinogênese de cabeça e pescoço, uma vez que atua na regulação negativa de *NF-kappa β* e de seus genes alvos.

Além disso, o gene *AES* também atua na via de sinalização do receptor Wnt, o qual é mediado, fora do núcleo, por um complexo entre proteínas ligantes de DNA da família Tcf e o co-ativador transcricional β -catenina. Esse modelo de sinalização Wnt/ β -catenin/Tcf apresenta importantes funções no desenvolvimento embrionários e está constitutivamente ativado em câncer colon-rectal (Lepourcelet & Shivdasani, 2002; Wong & Pignatelli, 2002). As proteínas da família Groucho, a qual pertence a proteína codificada pelo gene *AES*, atua reprimindo a ativação transcricional pelo complexo β -catenina-tcf, provavelmente pela interação direta com os fatores transcacionais tcf (Lepourcelet & Shivdasani, 2002). Dessa forma, a baixa expressão do gene *AES* pode estar contribuindo para uma maior ativação da

via de sinalização Wnt/ β -catenin/Tcf e, conseqüentemente, para a carcinogênese de laringe, a semelhança do que ocorre no câncer cólon-rectal.

O gene *ALS2CR3*, localizado em 2q33, apresentou evidência de baixa expressão nas amostras de tecido tumoral testadas (p -value = 0,000). Este gene é também denominado *GRIF-1* ou *TRAK2* e codifica um fator que interage com o receptor do ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA_A) e tem atuação no transporte intracelular, principalmente no transporte de mitocôndrias mediado por quinecinas (Brickley et al., 2005). Alterações desse gene têm sido associadas a doenças neurodegenerativas (Hadano et al., 2001). Entretanto, atualmente não há na literatura trabalhos que descrevam alterações de *ALS2CR3* em tecido neoplásico.

A cistatina B (CSTB), também chamada de estefina B, é uma pequena proteína de 11 kDa, membro da superfamília dos inibidores de proteinases de cisteína. As cistatinas têm recentemente emergido como importantes efetoras em múltiplas funções celulares como sobrevivência, proliferação, diferenciação, sinalização e imunomodulação (Keppler et al., 2006). As proteinases de cisteína, por sua vez, têm sido implicadas em múltiplos passos da progressão tumoral, incluindo passos precoces de imortalização e transformação (Fehrenbacher et al., 2004), passos intermediários na invasão tumoral e angiogênese (Joyce et al., 2004) e passos tardios na metástase e resistência a drogas (Zheng et al., 2004). A importância das proteinases de cisteínas no desenvolvimento de tumores sugere que as cistatinas podem ter um papel fundamental em muitas formas de salvar o organismo contra a progressão tumoral, uma vez que inibem a atuação dessas proteinases (Keppler et al., 2006).

A baixa expressão do gene *CSTB*, localizado em 21q22.3, foi observada em 5 de 24 estudos que avaliaram a expressão gênica em câncer de cabeça e pescoço pela técnica de microarray (revisão em Choi & Chen, 2005). No presente trabalho, o gene *CSTB*

apresentou evidência estatística de baixa expressão nas amostras tumorais de laringe analisadas ($p\text{-value} = 0,000$).

A baixa expressão de *CSTB* também já foi correlacionada com o desenvolvimento de outras neoplasias. Dessa forma, Mirtti et al. (2003) observaram baixa expressão desse gene em adenocarcinoma prostático, enquanto que Levicar et al (2002) associaram a baixa expressão da proteína CSTB com índices menores de sobrevivência livre de doença em pacientes com câncer de mama. Shiraishi et al. (1998), por sua vez, encontraram níveis reduzidos de RNA mensageiro e de marcação por imuno-histoquímica para a cistatina B em carcinoma esofágico. Trinkaus et al. (2005) também verificaram que tanto os níveis de proteína quanto de RNA mensageiro de *CSTB* foram significativamente mais baixos em meningiomas atípicos (grau II) do que em meningiomas benignos (grau I).

Cabe ressaltar também que mutações no gene *CSTB*, que levam à perda de sua expressão, têm sido consideradas o principal fator etiológico para o desenvolvimento da epilepsia mioclônica progressiva (EPMI) tipo Unverricht-Lundborg, uma doença autossômica recessiva (Alakurtti et al., 2005; Franceschetti et al., 2007; Joensuu et al., 2007).

O gene *DUSP1*, também chamado *MKP-1* e localizado em 5q35.1, apresentou evidência de baixa expressão nas amostras tumorais analisadas ($p\text{-value} = 0,000$). A baixa expressão desse gene já foi observada em câncer de cabeça e pescoço, mais especificamente em câncer oral, como também em câncer de ovário e próstata (Denkert et al., 2002; Rauhala et al., 2005; Tomioka et al., 2006). Em estudo realizado por Li et al. (2004) observou-se que a baixa expressão de *DUSP1* já podia ser observada em amostras de células da saliva de pacientes com carcinoma oral, constituindo um potencial biomarcador para detecção precoce desse tipo de neoplasia.

O gene *DUSP1* codifica uma fosfatase de dupla especificidade para tirosina e treonina e inativa proteína quinase ativada por mitógeno, além de suprimir a ativação dessa

proteína pelo oncogene *ras* (Lin & Yang, 2006). Esse gene é um candidato a supressor tumoral, sendo um alvo transcricional do gene *p53*, induzindo parada no ciclo celular e apoptose. Dessa forma, *DUSP1* tem um importante papel na regulação negativa da proliferação celular (Li et al., 2003; Lin & Yang, 2006). Unoki & Namakmura (2001), observaram que a expressão de *DUSP* foi induzida pela introdução de *PTEN* exógeno em linhagem celular de câncer endometrial. Dessa forma, *DUSP1* tem sido também considerado um mediador da via de sinalização do gene supressor tumoral *PTEN*.

O gene *DUSP1* parece ter também um papel na indução de senescência celular por meio da inibição da atividade do fator de transcrição AP-1 e o subsequente bloqueio de transcrição de genes envolvidos na replicação do DNA (Hardy et al., 2005). Adicionalmente, estudos realizados por Abraham & Clark (2006) enfatizam o papel de *DUSP1* como um regulador crítico da resposta imune inata, uma vez que este gene participa da regulação das vias de *JNK* (*c-Jun N-terminal Kinase*) e *p38 MAPK*. Dessa forma, seus níveis de expressão podem afetar profundamente a evolução de processos inflamatórios.

O gene *MAP3K5*, localizado em 6q25.1, apresentou evidência de baixa expressão nas amostras de tumores analisadas (*p-value* = 0,014). Este gene é também denominado *ASK1* e codifica uma quinase serina/treonina pró-apoptótica. A atividade catalítica da proteína codificada por *MAP3K5* pode ser ativada pelo fator de necrose tumoral α (TNF α), espécies de oxigênio reativas (ROS), danos no DNA e agentes quimioterápicos como cisplatina e taxol (Subramanian et al., 2004; Nagai et al., 2007).

A ativação de *MAP3K5* leva conseqüentemente a ativação da quinase N-terminal c-Jun (*JNK*) e da cascata de sinalização mediada pela quinase *p38 MAPK*, apresentando uma ampla variedade de funções biológicas como diferenciação celular e apoptose induzida por estresse e por sinais pró-inflamatórios (Mizumura et al., 2006; Nagai et al., 2007). A proteína *MAP3K5* liga-se também a muitas proteínas pro-apoptóticas tais como

TRAF-2, DAXX e ALG-2 para facilitar a morte celular mediada por TNF- α e Fas (Matsuzawa & Ichijo, 2001).

O papel pró-apoptótico de *MAP3K5* é reforçado pelos trabalhos de Dasgupta et al (2004) e de Kherrouche et al. (2006). Estudos realizados por Dasgupta et al (2004) indicam que a proteína do retinoblastoma, pRB, além de ter atividade antiproliferativa tem também funções anti-apoptóticas, mecanismo que ainda não é completamente compreendido. De acordo com os autores, pRB pode associar-se com MAP3K5 em resposta a sinais apoptóticos específicos. No entanto, MAP3K5 parece bloquear a ação de pRB e induzir a apoptose, além disso, a inativação de pRB por MAP3K5 correlaciona-se com aumento dos níveis da proteína pró-apoptótica p73. No estudo de Kherrouche et al. (2006) observou-se que a superexpressão do fator de transcrição *E2F1* induz a expressão do gene *MAP3K5*. Os autores também sugeriram que algumas das funções celulares de *MAP3K5* podem estar sob o controle de *E2F1* e que a superexpressão de *MAP3K5* pode favorecer a apoptose induzida por *E2F1* independentemente da via de *p53*.

Além disso, estudos realizados por Arvindsson et al., 2001, demonstraram que o agente anti-neoplásico paclitaxel, ativa *MAP3K5* e *JNK*, promovendo, *in vitro*, estabilização de microtúbulos em linhagem celular de neuroblastoma. Além disso, os autores observaram que *MAP3K5* induz apoptose em neuroblastoma principalmente via *p38 MAPK*.

O gene *PLAT* codifica o ativador de plasminogênio tipo tecidual e mapeia em 8p12. Este gene apresentou evidência de baixa expressão nas amostras de tecido tumoral analisadas (*p-value* = 0,000). O Ativador de plasminogênio tipo tecidual, codificado pelo gene *PLAT*, é uma protease de serina multidomínio, expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais. É responsável pela conversão do plasminogênio zimógeno em plasmina, uma enzima fibrinolítica (Kim et al., 2003). O ativador de plasminogênio tipo tecidual é secretado como uma proteína precursora de 70 kDA, composta por

aproximadamente 527 aminoácidos. A molécula tem 17 pontes de dissulfeto e uma cisteína livre adicional na posição 83 (Colen & Lunen, 2004).

Esta proteína tem um domínio *two-kringle*, o qual apresenta atividade anti-angiogênica (Shim et al., 2005). Domínios *kringles* são módulos de proteínas compostos de 78-80 aminoácidos conectados por uma *triple disulfite-linked loop*. Desde a descoberta que a angiostatina é um inibidor endógeno de angiogênese e crescimento tumoral, outras moléculas contendo domínios *Kringles* têm sido estudadas por sua atividade anti-angiogênica. O ativador de plasminogênio tipo tecidual (PLAT) é uma proteína relacionada à fibrinólise e têm dois domínios *kringles* com aproximadamente 29-30% de identidade com os domínios *kringles* da angiostatina (Kim et al., 2003).

Dessa forma, em contraste ao ativador de plasminogênio tipo uroquinase (PLAU), para o qual consideráveis evidências indicam que a superexpressão da enzima correlaciona-se com agressividade dos tumores, dentre eles câncer de cabeça e pescoço, especialmente câncer de laringe (Schmidt et al., 2000; Pacheco, 2002; Wojtukiewicz et al., 2003; Mengele et al., 2005), várias observações sugerem que altos níveis de ativador de plasminogênio tipo tecidual correlaciona-se com bom prognóstico em vários tipos de neoplasias, como melanoma, câncer de mama, como também de laringe (Ferrier et al., 2000; Chappuis et al., 2001; Wojtukiewicz et al., 2003). Enquanto que baixos níveis de ativador de plasminogênio tipo tecidual têm sido associado com a ocorrência de tumores malignos.

Estes dados sugerem que o aumento de expressão do gene *PLAT* pode ser benéfico, possivelmente devido à estimulação de geração de plasmina, a qual pode induzir a degradação da matriz de fibrina pró-angiogênica, necessária para a formação de novos vasos e subsequente apoptose de células endoteliais, resultando em inibição da angiogênese (Reijerkerk et al., 2000).

Recentemente, foi observado que o Neovastat, um inibidor de angiogênese derivado de cartilagem de tubarão estimula a geração de plasmina dependente do ativador de plasminogênio tipo tecidual. Além disso, várias proteínas anti-angiogênicas, como endostatina, angiostatina, anfoterina, maspina estimulam a atividade de *PLAT*. Tais evidências corroboram o papel anti-angiogênico do ativador de plasminogênio tipo tecidual (Gingras et al., 2004a; Gingras et al., 2004b).

Os genes *CRR9*, *UBL1* e *ZNF706*, por sua vez, em contraste a técnica de *microarray*, apresentaram alta expressão nas amostras de tecido tumoral analisadas pela técnica de PCR em tempo real. Todos esses genes mapeiam em regiões de ganho cromossômicos envolvidos na carcinogênese de cabeça e pescoço.

O gene *CRR9*, localizado em 5pter15.33, apresentou evidência de alta expressão nas amostras de tecido tumoral testadas ($p\text{-value} = 0,011$). As funções desse gene ainda não são claramente conhecidas, no entanto, sua alta expressão já foi observada em linhagens celulares de carcinoma renal quando comparada às células normais, como também em linhagem celular de câncer de ovário resistente ao tratamento com cisplatina (Yamamoto et al., 2001; Asakura et al., 2005).

O gene *UBL1*, também denominado *SUMO1*, apresentou evidência de alta expressão nos tumores analisados ($p\text{-value} = 0,007$) e mapeia em 2q33. Este gene parece estar envolvido em muitos processos celulares, incluindo apoptose, regulação da mitose, proliferação celular e regulação da transcrição, pois a proteína UBL1 pode interagir com fatores transcricionais como p53, c-jun, Sp-3, c-Myb e c/EBP, reduzindo suas atividades (Gill, 2004; Chen et al., 2006). A proteína UBL1 pode também formar complexos com as proteínas RAD51 e RAD52, as quais tem um papel essencial no reparo do DNA por recombinação homóloga. Estudos mostram que a superexpressão de *UBL1* regula negativamente o reparo por recombinação homóloga induzido por quebras de cadeia dupla de DNA em linhagem

celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e reduz a resistência celular à radiação ionizante em linhagem celular HT1080 (Li et al., 2000).

Em estudo recente realizado por Lee et al. (2005) foi observado que a proteína UBL1 também reprime a ativação do gene *MAP3K5*, o qual, como descrito anteriormente, apresentou baixa expressão nas amostras de tecido tumoral de laringe analisadas no presente trabalho. Dessa forma, a alta expressão do gene *UBL1* pode contribuir para o processo carcinogênico tanto por diminuir a capacidade de reparo de DNA por recombinação homóloga, como também por estar associada a baixa expressão de *MAP3K5*, o qual possui função pró-apoptótica.

O gene *ZNF706*, localizado em 8q22.3, apresentou evidência de alta expressão nos tumores analisados (*p-value* = 0,001). A família *zinc finger* é uma das principais famílias gênicas codificantes de fatores transcricionais. Membros dessa família podem atuar tanto como repressores como acentuadores da transcrição gênica, tendo participação no desenvolvimento embrionário, assim como em uma variedade de processos fisiológicos no organismo adulto (Xiang et al. 2006). Estudos têm revelado que os fatores de transcrição que contém motivos *zinc finger* são envolvidos no modelo de sinalização de proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK), o qual é um dos principais mecanismos de regulação celular eucariótica (Zhao et al., 2006). Atualmente não há na literatura trabalhos que correlacionem expressão alterada do gene *ZNF706* em tecidos transformados e também que descrevam funções mais específicas desse gene. No entanto, baixa expressão de outros membros da família *zinc finger*, como *ZNF185*, *ZNF212*, *ZNF262* e *ZNF273*, já foi observada em câncer de cabeça e pescoço (Alevisos et al. 2001; Gonzales et al., 2003; Sok et al., 2003; Kuriakose et al., 2004; Belbin et al., 2005). Como já mencionado anteriormente, genes dessa família podem atuar tanto como repressores como acentuadores da expressão gênica. Dessa forma,

dependendo de sua atuação, podem apresentar tanto alta quanto baixa expressão em tecidos transformados.

Os genes *CLK1*, *PTPRS*, *XRCC5*, *IL18BP* não apresentaram diferença de expressão nas amostras tumorais analisadas (*p-value* = 0,406; 0,083; 0,340 e 0,222, respectivamente) pela técnica de PCR em tempo real..

De acordo com o modelo Hanahan and Weinberg (2000), uma célula maligna precisa adquirir 6 alterações biológicas para levar a patogênese, como auto-suficiência em sinais de crescimento proliferativo, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, capacidade de angiogênese e indução de invasão. Em suporte a este modelo, o presente trabalho evidencia um conjunto de genes diferencialmente expressos, especialmente, *AES*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT* e *UBL1*, que podem diretamente ou indiretamente suprir estas vias.

Contudo, entre os genes validados como diferencialmente expressos, enfatizamos o gene *CSTB*, o qual apresentou, pelas técnicas de *microarray* e PCR em tempo real, baixa expressão em todas as amostras de tumor de laringe analisadas.

Como já mencionado, o gene *CSTB* possui função anti-metastática, pois inibi a ação de proteinases de cisteína lisossomais, as quais podem degradar a matriz extra-celular. No entanto, apesar de consideráveis evidências mostrarem que a expressão de proteinases de cisteína lisossomais estão alteradas em células tumorais quando comparadas às células normais, esta classe de proteinases tem recebido pouca atenção, pois a ênfase tem sido dada as metaloproteinasesde matriz como novos alvos para a terapia anti-câncer (Keppler, 2006). Contudo, estudos clínicos não têm evidenciado sucesso na terapia anti-câncer com o uso de inibidores de metaloproteases (Rosenthal & Matrisian, 2006). Isto tem levado ao crescente interesse pela superfamília das cistatinas como potenciais novos alvos da terapia anti-câncer. Recentes estudos pré-clínicos têm-se mostrado promissores (Gondi et al., 2004). Alguns

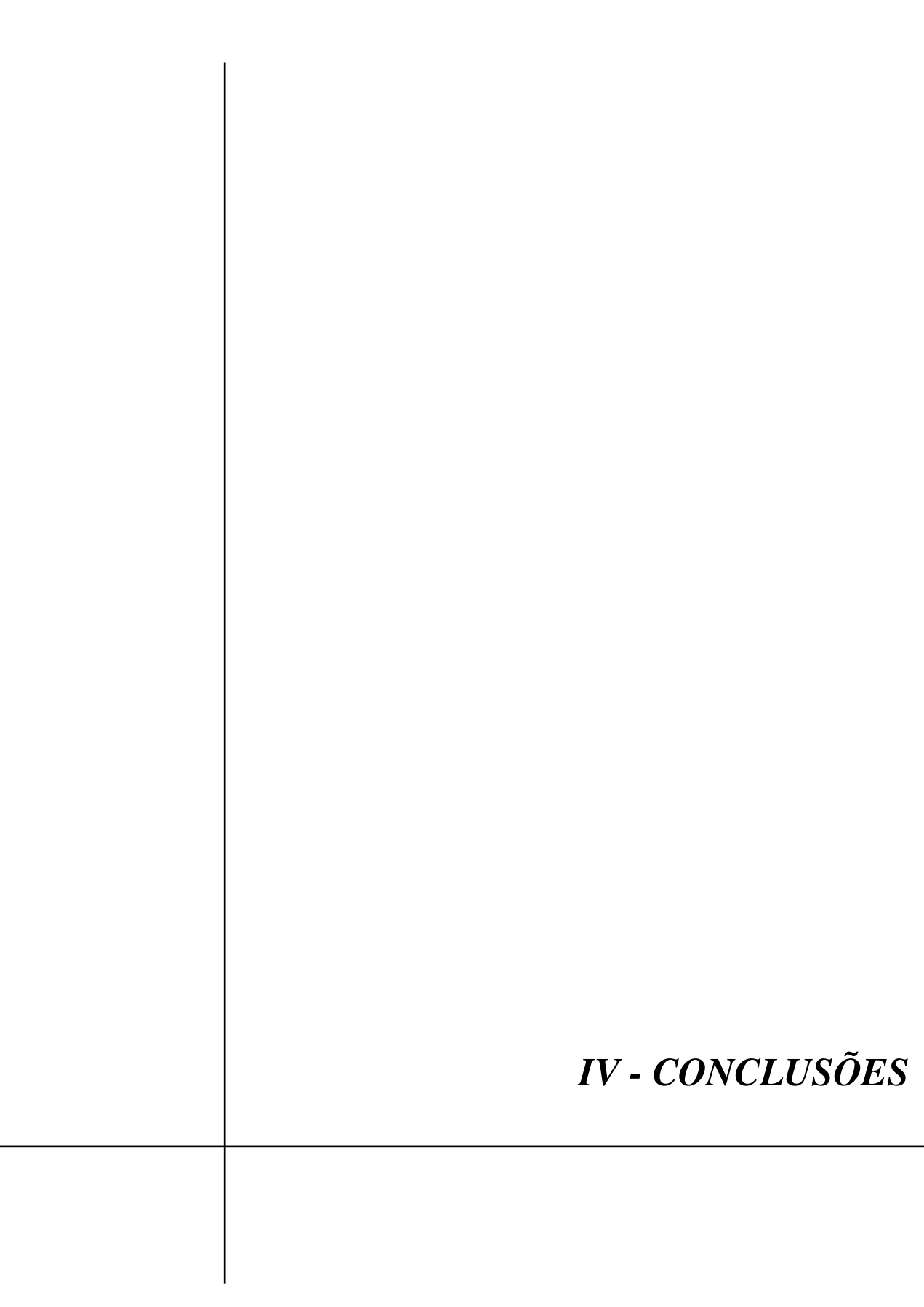
estudos clínicos também têm mostrado que algumas cistatinas podem ter potencial de prognóstico e/ou diagnóstico em vários tipos de neoplasias (Kos et al., 2000; Mirtti et al., 2003; Trinkaus et al., 2005).

Uma vez que a metástase regional em câncer de cabeça e pescoço diminui a sobrevivência em aproximadamente 50%, constituindo o principal fator prognóstico adverso independente para esse tipo de neoplasia (Lothaire et al., 2006), o gene *CSTB*, pela sua função anti-metastática, constitui um bom biomarcador em câncer de laringe, requerendo mais atenção em estudos futuros.

A identificação e a validação de genes diferencialmente expressos em HNSCC é extremamente importante, uma vez que os métodos clínicos e histopatológicos utilizados atualmente mostram-se insuficientes para prever a evolução clínica e a resposta a tratamento nos pacientes (Worsham et al., 2003).

Dessa forma, o presente trabalho validou 10 genes como diferencialmente expressos em tecido neoplásico de laringe quando comparado ao tecido histologicamente normal. Estes genes participam de vários processos celulares importantes como mencionado anteriormente, e alguns já foram observados como diferencialmente expressos em câncer de cabeça e pescoço, grupo ao qual os tumores de laringe fazem parte.

A identificação de uma assinatura de expressão gênica que possa distinguir tecido normal de tumoral, bem como prever a evolução clínica, resultará em diagnósticos e prognósticos mais efetivos e em abordagens terapêuticas mais adequadas para essa neoplasia. Os biomarcadores moleculares identificados nesse trabalho poderão resultar em novas patentes e em abordagens clínicas e terapêuticas mais adequadas para o câncer de laringe, que permanece como um dos mais frequentes e desfigurantes tumores que afetam tanto a duração como a qualidade de vida dos pacientes



IV - CONCLUSÕES

IV – CONCLUSÕES

Por meio do presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- 1) A técnica de *microarray* permite a identificação de genes diferencialmente expressos em tecido tumoral de laringe quando comparado ao tecido normal;
- 2) O conjunto de 35 genes, encontrados como diferencialmente expressos no presente trabalho, possui informação suficiente para a clusterização hierárquica das amostras de laringe em dois grupos, um normal e outro tumoral;
- 3) As principais categorias funcionais dos genes com alta expressão no tumor são apoptose, adesão celular, metabolismo, regulação da transcrição e transdução de sinal;
- 4) As principais categorias funcionais dos genes com baixa expressão no tumor são adesão celular, apoptose, ciclo celular, inibição de protease, proteólise, regulação da transcrição e reparo de DNA;
- 5) A técnica de RT-PCR em tempo real permite a validação de genes identificados como diferencialmente expressos pela técnica de *microarray*. No entanto, alguns genes podem não ser validados como diferencialmente expressos ou mostrar resultados opostos aos observados pela análise de *microarray*, o que reforça a necessidade e a importância das técnicas de validação;
- 6) Os genes validados, *ADCY6*, *AES*, *AL2SCR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* e *ZNF706*, participam de diferentes vias

metabólicas, como apoptose, ciclo celular, inibição de protease, proteólise, regulação da transcrição e reparo de DNA, e podem estar contribuindo significativamente para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de laringe;

- 7) Em todos os genes validados, exceto em *ALS2CR3*, observa-se correlação entre a sua alta ou baixa expressão em tumor de laringe e a sua localização em região cromossômica de ganho ou perda envolvida na carcinogênese de cabeça e pescoço, respectivamente.
- 8) O gene *CSTB*, o qual tem atividade anti-metastática por inibir a ação de proteases de cisteína, apresenta baixa expressão em todas as amostras e tumor analisadas por *microarray* e RT-PCR em tempo real, demonstrando ser um bom marcador de carcinogênese de laringe e merecendo mais atenção em estudos futuros;
- 9) Os genes validados fornecem informações importantes para a compreensão do desenvolvimento do câncer de laringe.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. M. & CLARK, A. R. Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses. **Bioch Society Trans**, v.34, p.1018-1023, 2006.

Al 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.

ALAKURTTI K. et al. Loss of lysosomal association of cystatin B proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations. **Eur J Hum Genet**, v.13, p.208-215, 2005.

ALEVIZOS, I. et al. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. **Oncogene**, v.20, p.696-6204, 2001.

AMBROSCH, P. et al. P16 alterations and retinoblastoma protein expression in squamous cell carcinoma and neighboring dysplasia from the upper aero-digestive tract. **Virchow Arch**, v.438, p.343-349, 2001.

ANDELA, V. B. et al. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappa β . **Cancer Res**, v.60, p.6557-6562, 2000.

ANGANDI, P.V. & KRISHNAPILLAI R. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: correlation with histological differentiation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endos**, v.103, p.30-35, 2007.

ARTESE, L. et al. Microvessel density (MDV) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, v.21, p.689-695, 2001.

ARVINDSSON, Y. ASK1 resistant neuroblastoma is deficient in activation of p38 kinase. **Cell Death Differ**, v. 8, p.1029-1037, 2001.

ASAKURA, T. et al. Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma. **Oncol Rep**, v.14, p601-607, 2005.

BAYAZIT, Y.A. et al. Ciclo-oxygenase 2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical correlates. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v.66, p.65-69, 2004.

BAZAN, V. et al. Prognostic significance of p16INK4a alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. **J Cell Physiol**, v.192, p.286-293, 2002.

BEER, D. G. et al. Gene expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinomas. **Nat Med**, v.8, p.816-824, 2002.

- BELBIN, T. J. et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using cDNA microarrays. **Cancer Res**, vol.62, p.1189-1190, 2002.
- BELBIN, T. J. et al. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 131, p.10-18, 2005.
- BENITO, M. et al. Adjustment of systematic microarray data biases. **Bioinformatics**, v.20, p.105-110, 2004.
- BINDHU, O. S. et al. High expression levels of nuclear factor kappa β and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.28, p.926-925, 2006.
- BONASSI, S. & AU, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutat Res**, v.7675, p.1-14, 2002.
- BOUCHARD, C. et al. Role alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P4500E21 genotypes and susceptibility to the cancer upper aerodigestive tract. **Int J Cancer**, v. 870, p.734-740, 2000.
- BRAAKHUIS, B. J. et al. Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v.59, p.1254-1260, 2006.
- BRENTANI, R. R. et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol/Hematol**, v. 54, p.95-105, 2005.
- BRICLKEY, K. et al. GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. **J Biol Chem**, v.280, p.14723-14732, 2005.
- CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. **Cancer Res**, v.56, p. 2488-2492, 1996.
- CANEVARI, R. A. & ROGATTO, S.R. Câncer de cabeça e pescoço. In: FERREIRA, C. G.; CASALI, J.C.R., organizadores. *Oncologia Molecular*. 1º ed. São Paulo: Atheneu, p.189-203, 2004.
- CAPOLUONGO, E. et al. GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. **Clinica Chimica Acta**, v.376, p.174-178, 2007.
- CAPPACIO, P. et al. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. **Head Neck**, v.22,p.234-240, 2000.
- CELANO, M. et al. Expression cyclase types III and VI in human hyperfunctioning thyroid nodules. **Mol Cell Endocrinol**, v. 203, p.129-135, 2003.
- CHANG, A. A. & WAES, C. V. Nuclear factor-kappa β as a common target and activator of oncogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Adv Otorhinolaryngol**, v.62, p.92-102, 2005.

- CHANG, D. D. et al. Characterization of transformation related genes in oral cancer cell. **Oncogene**, v.16, p.1921-1930, 1998.
- CHAPPUIS, P. O. et al. Functional evaluation of plasmin formation in primary breast cancer. **J Clin Oncol**, v.19, p.2731-3738, 2001.
- CHEN, A. et al. SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. **J Cell Biochem**, v.98, p.895-911, 2006.
- CHEN, B. et al. Validation of tissue array technology in head and neck squamous carcinoma. **Head Neck**, v.25, p.920-930, 2003b.
- CHEN, Z. et al. Comparison of gene expression between metastatic derivatives and their poorly metastatic parental cells implicates crucial tumor-environment interaction in metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Exp Metastasis**, v.20, p.335-342, 2003a.
- CHILD, E. S. & MANN, D. J. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. **Cell Cycle**, v. 5, p. 1313-1319, 2006.
- CHIN, D. et al. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. **Int J Cancer**, v.113, p.789-797, 2005.
- CHIU, S.T. et al. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, v.14, p.437-443, 2005.
- CHO, E. I. et al. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of COX-2 expression for local relapse in T1-2N0 larynx cancer treated with primary radiation therapy. **Laryngoscope**, v. 114, p.2001-2008, 2004.
- CHOI, C.S. et al. Low expression of p27(Kip1) in advanced mucoepidermoid carcinomas of head and neck. **Head Neck**, v.23, p.292-297, 2001.
- CHOI, P. & CHEN, C. Genetic expression profiles and biology pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer**, v.104, p.1113-1128, 2005.
- CHUNG, C. H. et al. Clinical applications of genomics in head and neck cancer. **Head Neck**, v.28, p.360-368, 2006.
- CHUNG, C. H. et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. **Cancer Cell**, v. 5, p.489-499, 2004.
- COLEN, D & LUNEN, H. R. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. **J Thromb Haemost**, vol.2, p.541-546, 2004.
- COON, S. et al. Prognostic implications of loss of heterozygosity at 8p21 and 9p21 in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v.111, p.206-212, 2004.
- CULHACI, N. et al. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. **B C Cancer**, v.4, p.42, 2004.

- DANAHEY D. et al. P16 mutation frequency and clinical correlation in head and neck cancer. **Acta Otolaryngol**, v.119, p.285-288, 1999.
- DASGUPTA, P. et al. Direct binding of apoptosis signal-regulating kinase 1 to retinoblastoma protein. **J Biol Chem**, v.279, p.38762-38769, 2004.
- DAVASCENA, A. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 Loci among Indians: Tobacco Exposure as a Risk Modulator. **Carcinogenesis**, 2007
- DE VICENTE, C. et al. Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. **Head Neck**, v.26, p.22-30, 2004.
- DENKERT, C. et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. **Int J Cancer**, v. 102, p 507-513, 2002.
- DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**, v. 24 p.9-17, 2005.
- DOHADWALA, M. et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. **J Biol Chem**, v.276, p.20809-20812, 2001.
- DONG, Y. et al. Prognostic significance of jab-1 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. **Clin Cancer Res**, vol.11, p.259-266, 2005.
- DOUILLARD, J.Y. et al. Randomized phase II feasibility study of combining the matrix metalloproteinases inhibitor BMS-275291 with paclitaxel plus carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.46, p.361-368, 2004.
- DYSVIK, B. et al. Gene expression profiles of head and neck carcinomas from Sudanese and Norwegian patients reveal common biological pathways regardless of race and lifestyle. **Clin Cancer Res**, v.12, p.1109-1120, 2006.
- EDSTROM, S. et al. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. **Laryngoscope**, v. 111, p.124-130, 2001.
- EL-NAGGAR, A. K. et al Differential expression profiling of head and neck squamous carcinomas: significance in their phenotypic and biological classification. **Oncogene**, v.21, p.8206-8219, 2002.
- EVANS, A. J. et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. **Head Neck**, v.26, p.63-70, 2004.
- FEHRENBACHER, M. et al. Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. **Cancer Res**, v.64, p.5301-5310, 2004.
- FERRIER, C. M. High t-PA-expression in primary melanoma of the limb correlates with good prognosis. **Br J Cancer**, v.83, p.1351-1359, 2000.

- FORD, A. C. & GRANDIS, J.R. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. **Head Neck**, v.25, p.67-73, 2003
- FRANCESCHETTI, S. et al. A pathogenetic hypothesis of Unverricht-Lundborg disease onset and progression. **Neurobiol Dis**, v.25, p.675-685, 2007.
- FRIEDMAN, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advance laryngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.23, p.280-285, 2001.
- GAJECKA, M. et al. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. **Mutat Res**, v. 57, p. 112-123, 2005.
- GARCIA DEL MURO, X. et al. p53 and p21 Expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. **Cancer**, v. 100: 1859–1867, 2004.
- GASCO, M & CROOK, T. The p53 network in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v.39, p.222-231, 2003.
- GATTÁS, G. et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CY2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. **Head Neck**, v.28, p. 819-826, 2006.
- GILL, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? **Genes Dev**, v.18, p.2046-2059, 2004
- GILROY, J.S. Impact of young age on prognostic for head and neck cancer: a matched-pair analysis. **Head Neck**, v.27, p.269-273, 2005.
- GINGRAS et al Activation of tissue plasminogen activator gene transcription by Neovastat, a multifunctional antiangiogenic agent. **Biochem Biophys Res Commun**. v.320, p205-212, 2004a.
- GINGRAS, D. et al. The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) stimulates tissue plasminogen activator activity. **Investigational New Drugs**, v.22, p.17-26, 2004b.
- GINOS, M. A. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of head and neck. **Cancer Res**, v.64,p.55-63, 2004.
- GLEICH, L.L & SALAMONE, F.N. Molecular genetics of head and neck cancer. **Cancer Control**, v.9, p. 369-378, 2002.
- GOAN, Y. G. Deregulated p21(WAF1) overexpression impacts survival of surgically resected esophageal squamous cell carcinoma patients. **Ann Thorac Surg**, v.80, p.1007-1016, 2005.
- GOLDENBERG, D. el al. Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck. **Am J Otorinol**, v.22, p.197-205, 2001.

- GOLUB, T.R. et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science**, v. 286, p.531-537, 1999.
- GONDI, C.S. et al. RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. **Oncogene**, v.23, p.:8486-8496, 2004.
- GONZALES, H.E. et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol. Head Neck Surg**, v. 129, p. 754-759, 2003.
- GOODIN, S. & ZIF, S.J. NSAIDs for the chemoprevention of oral cancer: promise or pessimism? **Clin Cancer Res**, v.10, p.1561-1564, 2004.
- GREENWALD, P. et al. Diet and cancer prevention. **Eur J Cancer**, v.37; p.948-965, 2001.
- HA, P.K. et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. **Clin Cancer Res**, vol. 9, p.3058-3064, 2003.
- HABDOUS, M. et al. Glutathione S-transferases genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies. **Ann Biol Clin**, v.62, p.15-24,2004.
- HADANO, S. et al. Cloning and characterization of three novel genes, ALS2CR1, ALS2CR2, and ALS2CR3, in the juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS2) critical region at chromosome 2q33-q34: candidate genes for ALS2. **Genomics**. v.70, p.200-213, 2001.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p. 57-70, 2000.
- HARDISSON, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Oncol**, v.260, p.502-508, 2003.
- HARDY, K. et al. Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. **Mol Biol Cell**, v.16, p.946-953, 2005.
- HARTMANN, K. A. et al. Gene expression profiling of advanced head and neck squamous cell carcinomas and two squamous cell carcinoma cell lines under radio/chemotherapy using cDNA array. **Radioth Oncol**, v.63, p.309-320, 2002.
- HASHIBE, M. et al. Meta and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP2E1 genotypes and risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, v.12, p.15098-1517, 2003.
- HEDGE, P. S. et al. Interplay of transcriptomics and proteomics. **Curr Opin Biotechnol**, v.14, p.647-651, 2003.
- HIRAI, T. et al. Reduced expression of p27 is correlated with progression in precancerous lesions of the larynx. **Auris Nasus Larynx**, v.30, p.163-168, 2003.
- HUANG, J. et al. Effects of ischemia on gene expression. **J Surg Res**, v.99, p.222-227, 2001.

HUNTER, K.D. et al. Profiling early head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v.5, p.127-135, 2005.

INCA - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em <http://www.inca.org.br>.

International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours, 6th ed. New York:Wiley-Liss, 2002.

IRIÉ, T. et al. Gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma using laser microdissection and cDNA microarray. **Med Electron Microsc**, v.37, p.89-96, 2004.

ITOH, S. et al. Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. **Oral Oncol**, v.39, p.829-835, 2003.

JANSEN, M.P.H.M. et al. Molecular classification of tamoxifen resistant breast carcinomas by gene expression profile. **J Clin Oncol**, v.23, p.732738, 2005

JEON, G.A. et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. **Int J Cancer**, v. 112, p.249-258, 2004.

JOENSUU ,T. et al. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. **Eur J Hum Genet**, v.15, p.185-193, 2007.

JOYCE, A. et al., Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis, **Cancer Cell**, v.5, p.443-453, 2004.

KAINUMA, K. et al. Differences in the expression of genes between normal tissue and squamous cell carcinomas of head and neck using cancer-related gene cDNA microarray. **Acta Otolaryngol**, v.126, p.967-974, 2006.

KALDIS, P. Another Piece of the p27^{Kip1} Puzzle. **Cell**, v. 26, p. 241-244, 2007.

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

KALYANKRISHA & GRANDIS. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck. **J Clin Oncol**, v.24, 2666-2672, 2006.

KAO et al. Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 and susceptibility to oral squamous cell carcinoma and oral precancer lesions associated with smoking/betel use. **J Oral Pathol Med**, v. 31, p.505-11, 2002.

KARP, G. Biologia Celular e Molecular: conceitos e experimentos. 3º ed. São Paulo: Manole, 2005, 786p.

KEPPLER, D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. **Cancer Lett**, v.235, p.159-176, 2006.

KEUM, K.C. et al. Predictive value of p53 and PCNA expression for occult neck metastases in patients with clinically node-negative oral tongue cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg** v.135, p.858-864, 2006.

KHADEMI, B. et al. The expresión of p53, c-erb-1 and c-erb-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patinets with head and neck tumors. **Cancer Lett**, v.184, p.223-230, 2002.

KHERROUCHE, Z. et al. ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a direct E2F target gene. **Biochem J**, v.396, p.547-556, 2006.

KIM, H.K. et al. Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator, **Biochem Biophys Res Commun** v.304, p.740-746, 2003.

KIM, M.M. & CALIFANO, J.A. Molecular pathology of head and neck cancer. **Int J Cancer**, v.112, p.545-553, 2004.

KNUUTILA, S. et al. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. **Am J Pathol** v.157, p.689, 2000.

KOONTONGKAEW, S. et al. Alterations of p53, pRb, cyclin D1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v.36,p.334-339, 2000.

KOS, J. et al. Cysteine proteinases and their inhbitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. **Int J Biol Markers**, v.15, p.84-89, 2000.

KUMAR, R. et al. Human papillomavirus, p53 and cyclin D1 expression in oropharyngeal carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Sur**, v.32, p.539-543, 2003.

KURIAKOSE, M.A. et al. Selection and validation of differentially expresses genes in head and neck cancer. **CMLS**. v. 61, p.1372-1383, 2004.

LANCASTER, J. M. Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, p.1733-1745, 2006.

LASKIN, J.& SANDLER, A. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. **Cancer Treat Rev**, v.30, p.1-17, 2004.

LEE, Y.S. et al. SUMO-1 represses apoptosis signal-regulating kinase 1 activation through physical interaction and not through covalent modification. **EMBO Rep**, v.6, p.949-955, 2005. .

LEMMER, E. R. Molecular diagnosis of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: the potential of gene expression profiling. **Semin Liver Dis**. v. 26, p.373-384, 2006.

- LEPOURCELET, M. & SHIVDASANI, R. A. Characterization of a novel mammalian Groucho isoform and its role in transcriptional regulation. **J Biol Chem**, v.277, p. 47732-47740, 2002..
- LEVICAR, N. et al. Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinopathological data of breast carcinoma patients. **Cancer Detect Prev**, v.26, p.42-49, 2002.
- LI M. et al. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. **J Biol Chem**, v.278, p.41059-41068, 2003.
- LI, W. et al. Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. **Nucleic Acids Res.** v.28, p.1145-1153, 2000.
- LI, Y. et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. **Clin Cancer Res**, v.10, p.8442-8450, 2004.
- LICHTENFELS, R. et al. Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. **Biochim Biophys Acta**, v.1646, p.21-31, 2003.
- LICITRA, L. et al. Cancer of the larynx. **Critical Rev Oncol/Hematol**, v.47, p.65-80, 2003.
- LIEW, K.J.L. & CHOW, V.T.K. Microarray and real-time RT-PCR analysis of a novel set of differentially expressed human gene in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. **J Virol Meth**, v.131, p.47-57, 2006.
- LIN, D. et al. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. **Head Neck**, v.24, p. 792-799, 2002.
- LIN, Y.W. & YANG, J.L. Cooperation of ERK and SCF^{Skp2} for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferatin signaling. **J Biol Chem**, v.281, p.915-926, 2006.
- LIU, C. J. et al. Molecular markers for prognostic evaluation of area-associated bucal squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.55, p.327-334, 2004.
- LIU, W.W. et al. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.132, p.395-400, 2005
- LOERCHER, A. et al. Nuclear factor-kB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v.64, p. 6511-6253, 2004.
- LOTHAIRE, P. et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. **Head Neck**, vol.28, p.256-269, 2006.
- MAHANIVONG, C. et al. Elevated urokinase-specific surface receptor expression is maintained through its interaction with urokinase plasminogen activator. **Mol Carcinogenesis**, v.46, p.165-175, 2007.

- MAO, L. et al. Leokoplakia: Molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Mol Med**, v.3, p.442, 1997.
- MARCHAND, A et al. Regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. **Mol Pharmacol**, v. 65, p. 1029-1037, 2004.
- MARSHALL, E. Getting the noise out of gene arrays. **Science**, v.306, p.630-631, 2004.
- MATSUZAWA, A. & ICCHIO, H. Molecular mechanisms of the decision between life or death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. **J Biochem**, v.130, p.1-8, 2001.
- MEIRELES, S. I. et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res**, v.64, p.1255-1265, 2004.
- MENGELE et al Tumor-associated prognostic factors of the plasminogen activator family: determination and clinical value of u-PA, t-PA, PAI-1, and PAI-2. **Hamostaseologie**, vol 25, p.301-310, 2005.
- MILAS, L. et al. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v.58, p.966-971, 2004.
- MINETA, H. et al. P53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 78, p. 1084-1090, 1998.
- MIRTTI, T. et al. Expression of cystatins, high molecular weight cytokeratin, and proliferation markers in prostatic adenocarcinoma and hyperplasia. **Prostate**, v.54, p.290-298, 2003.
- MIZUMURA, K. et al. Identification of Op18/stathmin as a potential target of ASK1-p38 MAP kinase cascade. **J Cell Physiol**. v .206, p.363-370, 2006.
- NAGAI, H. et al. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. **J Biochem Mol Biol**, v.40, p.1-16, 2007.
- NAGATA, M. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. **Int J Cancer**, v.106, p.683-689, 2003.
- NAKAMURA, T. et al. Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment. **Cancer Res**, v. 67, p. 139-48, 2007.
- NAMAZIE, A. et al. Cyclin D1 amplification and P16 (MTS1/CDK4) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. **Laryngoscope**, v.112, p.472-481, 2002.

- NEMES, J. A. p21^{WAF1/CIP1} expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.34, p. 274-279, 2005.
- NEUHAUS, T. et al. Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. **Toxicol Lett**, v. 151, p.273-282, 2004.
- NIMEUS, E. et al. Amplification of the cyclin D1 gene is associated with tumour subsite, DNA non-diploid and high S-phase fraction in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, v.40, p.624-629, 2004.
- NYLANDER, K. et al. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **J Oral Pathol Med**, v.29, p.413-425, 2000.
- NYSTROM, M. I. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition suppresses α v β 6 integrin-dependent oral squamous carcinoma invasion. **Cancer Res**, v.66, p.10833-10842, 2006.
- ONESTO, C. et al. Vascular endothelial growth factor- α and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. **Br J Cancer**, v.94, p.1516-1523, 2006.
- OPHUIS, O. et al. Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and risk for head and neck cancer. **Acta Otolaryngol**, v. 126, p.311-317, 2006.
- OUDE, O. et al. Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and the risk for head and neck cancer. **Acta Otolaryngol**, v.126, p.311-317, 2006.
- PACHECO, M. M. et al. Differential expression of c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinoma of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. **Head Neck**, v.5, p.705-715, 2002.
- PAPAKOSTA, V. et al. The co-expression of c-myc and p53 increases and reaches a plateau early in oral oncogenesis. **Anticancer Res**, v.26, p.2957-2962, 2006.
- PAVANELO, S & CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutat Res**, v.463, p.285-308, 2000.
- PENG, J. et al. Overexpression of cyclo-oxygenases 2 in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Human Pathol**, v.33, p.100-104, 2002.
- PEPPER M.S. Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. **Arterioscler Tromb Vasc Biol**, v.21, p.1104-17, 2001.
- PEREZ-DIEZ, A. et al. Microarrays for cancer diagnosis and classification. **Adv Exp Med Biol**, v593, p.74-85, 2007.
- PESCHOS, D. et al. Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferations and prognosis. **J Exp Clin Cancer Res**, v.24, p.431-437, 2005.

- PETTERS, E. S. Glutathine S-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, v.15, p.2196-2202, 2006.
- PHAN, J. et al. Comparative study of microarray data for cancer research. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v.4, p.2960-2963, 2004.
- PING, B. et al. Cytoplasmic expression of p21CIP1/WAF1 is correlated with IKKbeta overexpression in human breast cancers. **Int J Oncol.**, v. 29, p.1103-1110, 2006.
- PROVENZANO, M. & MOCELLIN, S. Complementary techniques: validation of gene expresión data by quantitative real time PCR. **Adv Exp Med Biol**, v.593, p.66-73, 2007.
- PRZYBOJEWSKA, B. et al. Immunohistochemical evaluation of P21ras and P53 proteins expression in human non-small cell lung cancer. **Neoplasia**, v.50, p.198-203, 2003.
- PUKKILA, M. et al. Nuclear and cytoplasmatic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications. **Head Neck**, v.24,p.784-791, 2002.
- PUTTI, T. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. **Histopatolgy**, v.41, p.144-151, 2002.
- QUACKENBUSH J. Microarray data normalization and transformation. **Nature Genetics**, v.32, p.496-501, 2002.
- RAGIN, C.C. et al. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillmavirus. **J Dent Res**, v.86 p.104-114, 2007.
- RANELLETTI, F. et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v.95, p.343-349, 2001.
- RAUHALA, H. E. et al. Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. **Int J Cancer**, v.117, p.738-745, 2005.
- REIJERKERK, A. et al. No grip, no growth: The conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. **Eur J Cancer**, v.36, p.1695-1705, 2000.
- REIS, E. M. et al. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. **Oncogene**, v.23, p.6684-6692, 2004.
- REIS, E. M. et al. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head and neck, and thyroid cancer. **Cancer Res**, v.65, p.1693-1699, 2005.
- RIJN, M. & GILKS, C.B. Applications of microarrays to histopathology. **Histopathology**, v.44, p.97-108, 2004.
- RING, B. Z. & ROSS, D. T. Microarrays and molecular markers for tumor classification. **Genome Biol**, v.3, p.1-6, 2002

- ROEPMAN, P. et al An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. **Nat Genet**, v.37, p.182-186, 2005.
- ROEPMAN, P. et al Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon lymph node metastasis. **Cancer Res**, v.66, p.11110-11114, 2006.
- ROSE, S.L. et al. p21 expression predicts outcome in p53-null ovarian carcinoma. **Clin Cancer Res** v. 9, p.1028–1032, 2003.
- ROSENTHAL, E.L. & MATRISIAN, L.M. Matriz metalloproteases in head and neck cancer. **Head Neck**, v. 28, p.639-48, 2006.
- RUIZ-GODOY, R.L.M. et al. Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v.25, p.73-78, 2006.
- RUSSO, G. et al. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. **Oncogene**, v.22, p.6497-6507, 2003.
- SAMARA, G. J. et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v.214, p.231-241, 2004.
- SAMARDOVA, J. et al. Analysis of tumor suppressor p53 status in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncol Rep** v.11, p.923-929, 2004.
- SANCHEZ, M. J. et al. Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. **Eur J Cancer Prev**, v.12, p.49-56, 2003.
- SCHIMMING, R. et al. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? **J Craniomaxillofac Surg**, v.32, p.176-181, 2004.
- SCHMIDT, M. et al. Urokinase receptor up-regulation in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.22, p.498-504, 2000.
- SCHMIDT, M. et al. Urokinase receptor up-regulation in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.22, p.498-504, 2000.
- SCULLY, C. et al Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol**, v.36, p.256-263, 2000a.
- SCULLY, C. et al Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. **Oral Oncol**, v.36, p.311-327, 2000b.
- SCULLY, C. et al. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. **Oral Oncol**, v.36, p.404-413, 2000c.
- SEDEVY, R. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. **J Oral Pathol Med**, v.32, 455-460, 2003.

SEREWKO, MM et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. **Cancer Res**, v.62, p.3759-3765, 2002.

SHIM et al. The kringle domain of tissue-type plasminogen activator inhibits in vivo tumor growth, **Biochem Biophys Res Commun** v.327, p.1155-1162, 2005.

SHIN, J. et al. Short hairpin RNA system to inhibit human p16 in squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.130, p.68-73, 2004.

SHINTANI, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C and D in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.40, p.13-20, 2004.

SHIRAISHI, T. et al. Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma using displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. **Int J Cancer**, v.79, p.175-178, 1998.

SLAUGHTER, D.P. et al. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: Clinical implication of multicentric origin. **Cancer (Phila)**, v.6, p.963-968, 1953.

SMITH, E M. et al. p16(INK4a) Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. **Oral Oncol**, Mar 12; [Epub ahead of print], 2007.

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, 2003.

SOK, J. C. et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targetting. **Clin Cancer Res**, v.12, p.5064-5073, 2006.

SOMOZA-MARTÍN, J. M. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, p.786-792, 2005.

SOTIRIOU, C. et al. Molecular profiling of head and neck tumors. **Curr Opin Oncol**, v.16, p.211-214, 2004.

SPELEMAN, L. et al. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma, **Head Neck**, 2006

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.24, p.874-887, 2002.

SUBRAMANIAN, R. R. et al. Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. **Exp Cell Res**, v.294, p581-591, 2004.

SUDBO, J. et al. Cyclooxygenases-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions. **Oral Oncol**, v.39, p.497-505, 2003.

SYRJÄNEN, S. et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, vol 32, p.854-866, 2005.

TAE, K. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. **Clin Cancer Res**. V.6, p.2821-2828, 2004.

TETSUKA, T. et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. **J Biol Chem**. v. 275, p.4383-4390, 2000.

THOMAS, G. R. et al. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Exp Path**, v.86, p.347-363, 2005.

TO-FIGUERAS, J. et al. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphism in relation to laryngeal carcinoma risk. **Cancer Lett**, v.187, p. 95-101, 2002.

TOMIOKA, H. et al. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**. v.35, p.206-211, 2006.

TOMODA, K. et al. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. **J Biol Chem**, v.277, p.2302-2310, 2002.

TRINKAUS M. e al. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and Cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. **Int J Biol Markers**, v.20, p.50-59, 2005.

ULANOVSKI, D. et al. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. **Oral Oncol**, v.40, p.532-537, 2004.

UNOKI, M. & NAKAMURA, Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. **Oncogene**, v.20, p.4457-4465, 2001.

VIELBA, R. et al. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. **Laryngoscope**, v.113, p.167-172, 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.110, p.374-381.

VOKES, E.E.; STENSON, K.M. Therapeutic options for laryngeal cancer. **N Engl J Med**, v.349, p.2087-2089, 2003.

VOLAVSEK, M. et al. Distribution and prognostic significance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. **J Laryngol Otol**, v.117, p.286-93, 2003.

WANG, Y. et al. DNA microarray reveals novel genes induced by mechanical forces in fetal lung type II epithelial cells. **Pediatric Res**, v.60, p. 118-124, 2006.

- WARNER, G.C. et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlates with nodal metastasis. **Int J Cancer**, v.110, p.857-868, 2004.
- WEN, Q. R. et al. Prognostic value of EGFR and TGF- α in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. **Laryngoscope**, v.106, p.884-888, 1996.
- WERNER, J. A. et al. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Clin Exp Metastasis**, v.19, p.275-282, 2002.
- WOJTUKIWICZ, M. Z. et al. Occurrence of components of fibrinolytic pathways in situ in laryngeal cancer. **Semin Thromb Hemost**, v.29, p.317-320, 2003.
- WONG, N.A.C.S. & PIGNATELLI M. β -Catenin - A Linchpin in colorectal carcinogenesis. **Am J Pathol**, v.160, p.389-401, 2002.
- WORSHAM, M. J. et al. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.129, p.702-708, 2003.
- XIANG A. et al novel human zinc finger protein ZNF540 interacts with MVP and inhibits transcriptional activities of the ERK signal pathway. **Biochem Biophys Res Commun**.v.347,p.288-296, 2006.
- YAMAMOTO, K. et al. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 280, p1148-1154, 2001.
- YUEN. P. W. 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.
- ZHAO, H. et al. Optimization and evaluation of T7 based RNA linear amplification protocols for cDNA microarray analysis. **BMG Genomics**, v.3, p.31, 2002.
- ZHAO, Y. et al. ZNF325, a novel human zinc finger protein with a RBaK-like RB-binding domain, inhibits AP-1- and SRE-mediated transcriptional activity. **Biochem Biophys Res Commun**. v.346, p.1191-1199, 2006.
- ZHENG, X. et al. Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L **Cancer Res**, v.64, p.1773-1780, 2004.

VI – ANEXO I

VI - ANEXO I

Descrição dos 139 genes que foram amplificados para a construção do cDNA *microarray*, segundo consulta ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e em Knuutila et al. (2000).

Description	Genome Mapping	Loss or gain region in head and neck cancer according by Knuutila et al. (2000)	HN Cluster	Reference Sequence	Function/ Process
Actinin, alpha 4 (ACTN4)	19q13.2	Loss	R1_CL308708_CT59	NM_004924.3	Protein binding/ Cell motility
Activating signal cointegrator 1 complex subunit (ASCC3L1)	2q11.2	Loss	R1_CL306547_CT1	NM_014014.2	Nucleic acid and protein binding/ mRNA processing
Activating transcription factor 1 (ATF1)	12q13.12	Loss	R1_CL182156_CT2	NM_005171.2	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl (ACOX1)	17q25.1	Gain	R1_CL212368_CT1	NM_004035.5	Acyl-CoA dehydrogenase activity/ Metabolism
Adenylate cyclase 6 isoform a (ADCY6)	12q14.1	Loss	R1_CL17269_CT2	NM_015270.2	Adenylate cyclase activity/ cAMP biosynthesis
ALL1 fused gene from 5q31 (AFF4)	5q31.1	Loss	R1_CL283420_CT4	NM_014423.3	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Alpha 1 type VII collagen precursor (COL7A1)	3p21.31	Loss	R1_CL54028_CT1	NM_000094.2	Serine-type endopeptidase inhibitor activity/ Cell adhesion
Alpha-kinase 1 (ALPK1)	4q25	Loss	R2_CLUSTER_24089	NM_025144.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Protein amino acid phosphorylation
Aminopeptidase puromycin sensitive (NPEPPS)	17q21.32	Gain	R1_CL32051_CT1	NM_006310.2	Metalloproteinase activity/ Proteolysis
Amino-terminal enhancer of split isoform b (AES)	19p13.3	Loss	R1_CL309068_CT2	NM_198969.1	Transcription corepressor activity/ Transcription regulation

AMME chromosomal region gene 1-like (AMMECR1L)	2q21.2	Loss	R1_CL148773_CT1	NM_031445.2	Unknown/Unknown
Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 (ALS2CR3)	2q33.1	Gain	R1_CL303821_CT1	NM_015049.1	GABA receptor binding/ Neurotransmitter transport
Androgen-induced prostate proliferative shutoff (APRIN)	13q13.1	Loss	R2_CLUSTER_28626	NM_015032.1	Transferase activity/ Cell proliferation
Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)	10q26.2	Loss	R1_CL314386_CT11	NM_002417.3	Nucleotide and protein binding/ Cell cycle
Arginine rich, mutated in early stage tumors (ARMET)	3p21.31	Loss	R1_CL289881_CT1	NM_006010.2	Unknown/Unknown
AT rich interactive domain 2 (ARID RFX-like) (ARID2)	12q12	Loss	R1_CL308219_CT3	NM_152641.2	DNA and protein binding/ Transcription regulation
Attractin-like 1 (ATRNL1)	10q25.3	Loss	R1_CL210096_CT1	NM_207303.2	Receptor activity/ Development
Breast cancer anti-estrogen resistance 3 (BCAR3)	1p22.1	Loss	R1_CL329575_CT2	NM_003567.2	Protein binding/ Cell cycle
Bridging integrator 1 isoform 6 (BIN1)	2q21.1	Loss	R1_CL60463_CT1	NM_139348.1	Protein binding/ Cell cycle
cAMP-dependent protein kinase regulatory (PRKAR2B)	7q22.3	Gain	R2_CLUSTER_27035	NM_002736.2	Nucleotide binding/ Intracellular signaling
cAMP-specific phosphodiesterase 4D (PDE4D)	5q11.2	Loss	R1_CL186152_CT1	NM_006203.3	Hydrolase activity/ Signal transduction
Caspase 1 isoform beta precursor (CASP1)	11q22.3	Loss	R1_CL273774_CT1	NM_001223.3	Caspase activator activity/ Apoptosis
Catenin (cadherin-associated protein) beta 1 (CTNNB1)	3p22.1	Loss	R1_CL313072_CT43	NM_001904.2	Structural molecule activity, transcription factor activity/ Cell adhesion, Transcription regulation
CDC-like kinase 1 (CLK1)	2q33.1	Gain	R1_CL306959_CT1	NM_004071.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Cell proliferation
Chromatin modifying protein 2A (CHMP2A)	19q13.43	Loss	R1_CL161650_CT3	NM_198426.1	Unknown Protein transport
Chromosome 7 genomic contig	7q34	Gain	R1_14306_CT2	NT_007914.14	Unknown/ Unknown
Cisplatin resistance related protein (CRR9)	5pter15.33	Gain	R1_CL315539_CT1	NM_030782.2	Unknown/ Unknown

COP9 signalosome subunit 8 isoform 1 (COPS8)	2q37.3	Loss	R1_CL237148_CT2	NM_006710.4	Protein binding/ Unknown
Cortactin isoform a (CTTN)	11q13.3	Gain	R1_CL343806_CT1	NM_005231.2	Protein binding/ Unknown
Cyclin D1 (CCND1)	11q13.3	Gain	R1_CL90322_CT3	NM_053056.2	Cyclin-dependent protein kinase regulator activity/ Cell cycle
Cystatin B (CSTB)	21q22.3	Loss	R1_CL240674_CT4	NM_001000.2	Cysteine protease inhibitor activity/ Protease inhibition
Cytokine inducible SH2 containing protein (CISH)	3p21.31	Loss	R1_CL308680_CT1	NM_145071.1	Unknown/ Signal transduction
D4 zinc and double PHD fingers family 2 (DPF2)	11q13.1	Gain	R1_CL64522_CT4	NM_006268.3	Nucleic acid and protein binding/ Apoptosis
Diacylglycerol kinase eta isoform 1 (DGKH)	13q14.11	Loss	R1_CL180127_CT1	NM_152910.3	Diacylglycerol kinase activity/ Intracellular signaling cascade
DnaJ homology subfamily A member 5 isoform 2 (DNAJA5)	5p13.2	Gain	R1_CL260138_CT3	NM_001012339.2	Nucleic acid and protein binding/ Protein folding
Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1)	5q35.1	Loss	R1_CL117820_CT4	NM_004417.2	MAP kinase phosphatase activity/ Cell cycle
Dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1) (DAG1)	3p21.31	Loss	R1_25779_CT4	NM_004393.1	Protein binding/ Cell adhesion
Ephrin-A5 (EFNA5)	5q21.3	Loss	R1_CL182109_CT1	NM_001962.1	Ephrin receptor binding/ Cell-cell signaling
Epithelial protein lost in neoplasm beta (LIMA1)	12q13.12	Loss	R1_CL316114_CT1	NM_016357.3	Actin filament binding/ Organization and biogenesis
Family with sequence similarity 62 (C2 domain) (FAM62A)	12q13.2	Loss	R1_CL139514_CT2	NM_015292.1	Unknown/ Unknown
Fibronectin type III domain containing 3B (FNDC3B)	3q26.31	Gain	R1_CL171287_CT4	NM_022763.2	Unknown/ Unknown
Four and a half LIM domains 2 (FHL2)	2q12.1	Loss	R1_CL69822_CT3	NM_001450.3	Transcription coactivator activity/ Transcription regulation
Glutathione S-transferase pi (GSTP1)	11q13.3	Gain	R1_CL315103_CT13	NM_000852.2	Glutathione transferase activity/ Metabolism
Hematopoietically expressed homeobox (HHEX)	10q23.33	Loss	R1_CL243018_CT1	NM_002729.4	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Hepatitis B virus x-interacting protein (HBXIP)	1p13.3	Loss	R1_CL294006_CT1	NM_006402.2	Protein binding/ Apoptosis

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (HNRPR)	1p36.11	Loss	R1_CL259954_CT4	NM_005826.2	RNA binding/ mRNA processing
HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa (HTATIP2)	11p15.1	Loss	R1_CL167890_CT2	NM_006410.3	Transcription coactivator activity/ Transcription regulation
Hypothetical protein LOC10826 isoform 1 (C5orf4)	5q33.2	Loss	R1_CL58915_CT2	NM_016348.1	Catalytic activity/ Metabolism
Hypothetical protein LOC162427 (LOC162427)	17q21.2	Gain	R1_CL258959_CT1	NM_178126.2	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC259282 (FAM44A)	4p15.33	Loss	R1_CL92010_CT1	NM_148894.2	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC283635 isoform 2 (C14orf24)	14q13.2	Loss	R1_CL176160_CT1	NM_001079519.1	Acylphosphatase activity/ Unknown
Hypothetical protein LOC339766 (LOC339766)	2q37.1	Loss	R1_CL224574_CT1	XM_939706	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC374395 (LOC374395)	11q12.3	Loss	R1_CL141460_CT3	NM_199337.1	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC79863 (C18orf22)	18q23	Loss	R1_186193_CT1	NM_024805.1	RNA binding/ rRNA processing
Hypothetical protein LOC84319 (C3orf26)	3q12.1	Gain	R1_CL27336_CT1	NM_032359.2	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC84910 (TMEM87B)	2q13	Loss	R2_CLUSTER_28435	NM_032824.1	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC85002 FAM86B1	8p23.1	Loss	R1_CL198837_CT1	NM_032916.3	Unknown/ Unknown
Hypothetical protein LOC91368 (MGC13017)	5q31.1	Loss	R1_CL310111_CT1	NM_080656.1	Unknown/ Unknown
IKK interacting protein isoform 3.1 (IKIP)	12q23.1	Loss	R1_CL299091_CT1	NM_201613.1	Protein binding/ Apoptosis
Immunoglobulin superfamily member 2 (IGSF2)	13q31.1	Loss	RC3-HN0029-221100-011-g01	NM_004258.1	Unknown/ Signal Transduction
Integrin alpha chain alpha 6 isoform a (ITGA6)	2q31.1	Gain	R1_CL268742_CT3	NM_001079818.1	Protein binding/ Cell adhesion
Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide) (ITGA5)	12q13.13	Loss	R1_CL308230_CT1	NM_002205.2	Protein binding/ Cell adhesion
Interleukin 18 binding protein precursor (IL18BP)	11q13.4	Gain	R1_CL305797_CT10	NM_001039659.1	Receptor antagonist activity/ T-helper 1 type immune response

Interleukin enhancer binding factor 3 isoform b (ILF3)	19p13.2	Loss	R1_294710_CT3	NM_004516.2	Transcription regulator activity/ Transcription regulation
Jumonji domain containing 1B (JMJD1B)	5q31.2	Loss	R1_CL303776_CT1	NM_016604.3	Oxidoreductase activity/ Transcription regulation
Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)	19p13.2	Loss	R1_15270_CT3	NM_012289.3	Transcription regulator activity/ Transcription regulation
Latrophilin 3 precursor (LPHN3)	4q13.1	Loss	R2_CLUSTER_30293	NM_015236.3	Receptor activity/ Signal Transduction
LATS large tumor suppressor homolog 1 (Drosophila) (LATS1)	6q25.1	Loss	R1_CL14643_CT1	NM_004690.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Cell cycle
Leucine rich repeat containing 57 (LRRC57)	15q15.2	Gain	R1_CL112617_CT1	NM_153260.1	Protein binding/ Unknown
Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)	12q12	Loss	R1_CL254473_CT1	NM_198578.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Signal transduction
Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)	5p13.1	Gain	R1_CL74481_CT1	NM_002310.3	Protein binding/ Cell proliferation
LIM domain only 4 (LMO4)	1p22.3	Loss	R1_CL43335_CT1	NM_006769.2	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Matrix metalloproteinase 3 (MMP3)	11q22.2	Loss	R1_CL80351_CT1	NM_002422.3	Stromelysin 1 activity/ Proteolysis
Mediator of RNA polymerase II transcription (MED11)	17p13.2	Loss	R1_CL173670_CT1	NM_001001683.1	Protein binding/ Unknown
Metastasis suppressor 1 (MTSS1)	8q24.13	Gain	R1_CL276939_CT1	NM_014751.2	Receptor binding/ Cell motility
Methyl-CpG binding domain protein 2 isoform 1 (MBD2)	18q21.2	Loss	R1_240581_CT4	NM_003927.3	Transcriptional repressor activity/ Transcription regulation
Microtubule-associated protein 4 isoform 1 (MAP4)	3p21.31	Loss	R1_CL308445_CT13	NM_002375.3	Structural molecule activity/ Negative regulation of microtubule depolymerization
Mitogen-activated protein kinase 8 isoform JNK1 (MAPK8)	10q11.22	Loss	R1_CL276260_CT1	NM_002750.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Apoptosis
Mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP3K5)	6q25.1	Loss	R1_CL237238_CT1	NM_005923.3	MAP kinase kinase activity/ Apoptosis

Mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MAP3K7IP3)	Xp21.2	Loss	R1_CL154747_CT1	NM_152787.3	Protein kinase activity/ Signal transduction
Mouse double minute 2 homolog isoform MDM2 (MDM2)	12q15	Loss	R1_CL77132_CT2	NM_002392.2	Protein binding/ Cell proliferation
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL)	11q23.3	Loss	R1_CL244629_CT1	NM_005933.2	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Nuclear distribution gene C homolog (NUDC)	1p35.1	Loss	R1_CL308547_CT5	NM_006600.2	Protein binding/ Cell proliferation
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene (NFKBIL1)	6p21.33	Loss	R1_CL303075_CT1	NM_005007.2	Protein binding/ Transcription regulation
Nuclear matrix protein p84 (THOC1)	18p11.32	Gain	R1_227909_CT2	NM_005131.1	DNA, RNA and protein binding/ Signal transduction
Nuclear matrix transcription factor 4 isoform a (ZNF384)	12p13.31	Gain	R1_CL153745_CT2	NM_001039916.1	Nucleic acid binding/ Transcription regulation
Nuclear mitotic apparatus protein 1 (NUMA1)	11q13.4	Gain	R1_CL318069_CT3	NM_006185.2	Protein binding/ Organization and biogenesis
PHD finger protein 11 isoform b (PHF11)	13q14.2	Loss	R1_CL136422_CT10	NM_001040444.1	Protein binding/ Unknown
PHD finger protein 15 PHF15	5q31.1	Loss	R1_CL71875_CT1	NM_015288.4	Protein binding/ Unknown
Phosphate cytidylyltransferase 1 choline alpha (PCYT1A)	3q29	Gain	R1_CL252687_CT1	NM_005017.2	Transferase activity/ Biosynthesis
Phosphofructokinase muscle (PFKM)	12q13.11	Loss	RC4-HN0030-151100-011-a11	NM_000289.3	Protein kinase activity/ Glycolysis regulation
Plasminogen activator tissue type isoform 2 (PLAT)	8p11.21	Loss	R1_CL186187_CT2	NM_000930.2	Plasminogen activator activity/ Proteolysis
Polyhomeotic-like 2 isoform b (PHC2)	1p35.1	Loss	R1_CL135128_CT3	NM_004427.3	DNA and protein binding/ Development
Prefoldin subunit 5 isoform gamma (PFDN5)	12q13.13	Loss	R1_CL305855_CT2	NM_145897.2	Transcription corepressor activity/ Transcription regulation
Prenyl protein peptidase RCE1 isoform 2 (RCE1)	11q13.3	Gain	R1_CL233758_CT2	NM_001032279.1	Hydrolase activity/ Proteolysis
Prickle-like 2 (PRICKLE2)	3p14.1	Loss	R1_CL163834_CT1	NM_198859.1	Metal ion binding/ Unknown
PRKC apoptosis WT1 regulator (PAWR)	12q21.2	Loss	R1_CL22195_CT3	NM_002583.2	Transcription corepressor activity/ Apoptosis

Protein geranylgeranyltransferase type I beta (PGGT1B)	5q22.3	Loss	R1_CL18320_CT1	NM_005023.2	Transferase activity/ Protein amino acid geranylgeranylation
Protein tyrosine phosphatase non-receptor type PTPN18 (PTPN18)	2q21.1	Loss	R1_CL308813_CT7	NM_014369.2	Protein tyrosine phosphatase activity/ Cell cycle
Protein tyrosine phosphatase receptor type sigma (PTPRS)	19p13.3	Loss	R1_CL310075_CT12	NM_002850.3	Protein tyrosine phosphatase activity/ Cell adhesion
Protein a zinc finger 706 (ZNF706)	8q22.3	Gain	R1_CL164403_CT3	NM_016096.3	Nucleic acid binding/ Unknown
Purine-rich element binding protein A (PURA)	5q31.3	Loss	R1_CL308628_CT1	NM_005859.3	RNA polymerase II transcription factor activity/ Replication and transcription regulation
Reg receptor (EXTL3)	8p21.1	Loss	R1_CL90011_CT2	NM_001440.2	Transferase activity, transferring glycosyl groups/ Unknown
Restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein) (RSN)	12q24.31	Loss	R1_CL117078_CT1	NM_002956.2	Protein binding/ Cell cycle
Retinoblastoma 1 (RB1)	13q14.2	Loss	R1_CL43373_CT1	NM_000321.2	Protein binding/ Cell cycle
Ribonuclease T2 precursor (RNASET2)	6q27	Loss	R1_CL72807_CT2	NM_003730.3	Endoribonuclease activity/ RNA catabolism
Ribosomal protein S8 (RPS8)	1p34.1	Loss	R1_CL306039_CT6	NM_001012.1	RNA binding/ Translation
Ring finger protein 13 isoform 1 (RNF13)	3q25.1	Gain	R1_CL143318_CT10	NM_007282.3	Protein binding/ Unknown
RNA binding motif protein 14 (RBM14)	11q13.3	Gain	R1_CL140107_CT1	NM_006328.2	Nucleic acid and protein binding/ Transcription regulation
RNA binding motif protein 5 (RBM5)	3p21.31	Loss	R1_CL250624_CT4	NM_005778.1	Nucleotide binding/ Cell cycle
Roquin (RC3H1)	1q25.1	Gain	R1_CL192991_CT2	NM_172071.1	RNA and protein binding
Round spermatid basic protein 1-like (RSBN1L)	7q11.23	Gain	R1_CL192364_CT2	NM_198467.1	Unknown/ Unknown
Serum amyloid A1 preproprotein (SAA1)	11p15.1	Loss	R1_CL311850_CT1	NM_000331.3	G-protein-coupled receptor binding/ Cell adhesion
SID1 transmembrane family member 2 (SIDT2)	11q23.3	Loss	R1_CL49195_CT4	NM_001040455.1	Unknown/ Unknown
Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (STAT3)	17q21.2	Gain	R1_CL90946_CT7	NM_139276.2	Transcription factor activity/ Transcription regulation

Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)	2q32.2	Gain	R1_CL44297_CT1	NM_003151.2	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Skeletal muscle ryanodine receptor isoform 1 (RYR1)	19q13.2	Loss	R2_CLUSTER_8601	NM_000540.2	Receptor activity/ Transport
Sma- and Mad-related protein 2 (SMAD2)	18q21.1	Loss	R1_314249_CT1	NM_005901.4	Transcriptional activator activity/ Transcription regulation
Small conductance calcium-activated potassium (KCNN3)	1q22	Gain	R1_CL55643_CT1	NM_170782.1	Calcium-activated potassium channel activity/ Transport
Solute carrier family 12 (potassium/chloride) (SLC12A4)	16q22.1	Loss	CM4-HN0022-090101-453-e09	NM_005072.3	Transporter activity/ Transport
Solute carrier family 13 (sodium-dependent) (LC13A5)	17p13.1	Loss	R1_CL62589_CT1	NM_177550.2	Transporter activity/ Transport
Squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells 3 (SART3)	12q23.3	Loss	R1_CL249877_CT1	NM_014706.3	RNA binding/ RNA processing
Suppression of tumorigenicity 14 (ST14)	11q24.3	Gain	R1_CL316882_CT2	NM_021978.3	Serine-type endopeptidase activity/ Proteolysis
SWI/SNF-related matrix-associated (SMARCA4)	19p13.2	Loss	R1_309522_CT4	NM_003072.2	Transcription factor activity/ Transcription regulation
T-cell leukemia translocation altered (TCTA)	3p21.31	Loss	R1_CL63525_CT3	NM_022171.1	Unknown/ Unknown
Telomeric repeat binding factor 1 isoform 1 (TERF1)	8q13.3	Gain	R1_CL308320_CT2	NM_017489.1	Double-stranded telomeric DNA binding/ Telomere maintenance via telomerase
Thyroid hormone receptor associated protein 2 (THRAP2)	12q24.21	Loss	R1_CL84119_CT1	NM_015335.2	Receptor activity/ Transcription regulation
Transducer of regulated cAMP response (CRTC2)	1q21.1	Gain	R1_CL98433_CT3	NM_181715.1	Protein binding/ Unknown
Tripartite motif-containing 8 (TRIM8)	10q24.32	Loss	R1_CL269655_CT1	NM_030912.1	Protein binding/ Unknown
Tumor protein p53 binding protein, 2 (TP53BP2)	1q42.11	Gain	R1_CL303671_CT2	NM_001031685.2	Protein binding/ Apoptosis
Ubiquitin specific protease 54 (USP54)	10q25.3	Loss	R1_CL115398_CT1	NM_152586.3	Protein binding/ Ubiquitin-dependent protein catabolism

Ubiquitin-like 1 (sentrin) (UBL1)	2q33.1	Gain	R1_CL327107_CT1	NM_001005781.1	SUMO conjugating enzyme activity/ DNA Repair
V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene (ETS2)	21q22.2	Loss	R1_CL89976_CT5	NM_005239.4	Transcription factor activity/ Transcription regulation
Vinculin transcript variant meta (VCL)	10q22.2	Loss	R1_CL307412_CT3	NM_003373.3	Structural molecule activity/ Cell adhesion
V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog (RAF1)	3p25.2	Loss	R1_CL288015_CT3	NM_002880.2	Protein serine/threonine kinase activity/ Cell proliferation
WD repeat domain 5 (WDR5)	9p34.2	Loss	R1_CL175289_CT1	NM_017588.2	Protein binding/ Development
X-ray repair defective repair in Chinese hamster cells (XRCC5)	2q35	Loss	R1_CL315103_CT23	NM_021141.2	ATP-dependent DNA helicase activity/ DNA repair
Zinc finger MYND domain containing 11 isoform (ZMYND11)	10p14	Gain	R1_CL240566_CT7	NM_006624.3	Protein binding/ Transcription regulation
Zinc finger protein multitype 2 (ZFPM2)	8q23.1	Gain	R1_CL252686_CT1	NM_012082.2	Transcription corepressor activity/ Transcription regulation

VII – OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Methylation profile of genes *CDKN2A* (*p14* and *p16*), *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23* in head and neck cancer

Marilia F. Calmon^a, Jucimara Colombo^a, Fabrício Carvalho^b, Fátima P. Souza^a,
José F.G. Filho^c, Érica E. Fukuyama^c, Anamaria A. Camargo^b, Otávia L.S. Caballero^d,
Eloíza H. Tajara^e, José A. Cordeiro^e, Paula Rahal^{a,*}

^aDepartment of Biology, UNESP-IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^bLudwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua João Julião, 245, 1st floor, Paraíso, CEP: 01323-903 São Paulo, SP, Brazil

^cCancer Institute Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, Rua Dr. Cesário Motta Júnior, 112, Vila Buarque, CEP: 01221-020 São Paulo, SP, Brazil

^dLudwig Institute for Cancer Research—New York Branch of Human Cancer Immunology at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, BOX 32, New York, NY 10021-6007

^eSchool of Medicine of São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, CEP: 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

Received 5 April 2006; received in revised form 7 August 2006; accepted 8 September 2006

Abstract

Hypermethylation in the promoter region has been associated with a loss of gene function that may give a selective advantage to neoplastic cells. In this study, the methylation pattern of genes *CDKN2A* (alias *p14*, *p14^{ARF}*, *p16*, *p16^{INK4a}*), *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23* was analyzed in 43 samples of head and neck tumors using methylation-specific polymerase chain reaction. In the oropharynx, there was a statistically significant association between hypermethylation of the *DAPK1* gene and the occurrence of lymph node metastases, and in the larynx there was statistically significant evidence of an association between hypermethylation of the *ADAM23* gene and advanced stages of the tumors. Thus, a correlation was observed between hypermethylation of the promoter region of genes *DAPK1* and *ADAM23* and the progression of head and neck cancer. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Head and neck cancer is a major public health problem worldwide. For instance, head and neck squamous cell carcinomas currently occur at a rate of approximately 500,000 new cases yearly [1]. Carcinogenesis is a multistep process, characterized by the accumulation of genetic alterations and by epigenetic alterations, which are in turn characterized by an inherited process during cellular division, without any alterations in the DNA sequence [1,2–4].

Recent advances in transcriptome studies have resulted in new approaches in the identification of epigenetic changes associated with cancer. There is a growing list of tumor suppressor genes silenced by hypermethylation of the promoter region and of oncogenes that are activated as a consequence of hypomethylation, observed in certain types of cancer [5].

The study of epigenetics, especially methylation of DNA, offers a great potential for the identification of biomarkers that can be used in the diagnosis of the first stages of cancer development and for a more accurate evaluation of the individual risk of developing the disease [6]. Among these biomarkers are the genes *p14*, *p16*, *DAPK1* (death-associated protein kinase 1), *CDH1* (E-cadherin; alias *E-CAD*), and *ADAM23* (ADAM disintegrin and metalloproteinase domain 23).

The *INK4a/ARF* locus is located on chromosome 9p21 and has the unique distinction of encoding two cell cycle-regulatory genes, *p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}*. Briefly, alternative splicing of the first exon and common downstream exons permits one gene to encode two different products, which function via two distinct pathways to inhibit cell cycle progression [7].

The protein encoded by the tumor suppressor gene *p14* is involved in the regulation of the cell cycle, interrupting phases G1 or G2 [8]. Previous studies have reported that epigenetic alterations of the *p14* gene are important events in head and neck carcinogenesis and in the development of benign tumors [9,10]. The product of the tumor suppressor gene

* Corresponding author. Tel.: +55-17-3221-2379; fax: +55-17-3221-2496.

E-mail address: rahalp@yahoo.com.br (P. Rahal).

p16 acts as a negative regulator of cellular proliferation through the interaction with the CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) protein by inhibiting its kinase activity [11,12]. The methylation mechanism whose consequence is the transcriptional silencing of the *p16* gene was observed in epidermoid carcinomas of the head and neck, particularly of the oral cavity [12,13].

The *DAPK1* gene encodes a calmodulin-dependent serine-threonine kinase. This protein is classified as a positive mediator of apoptosis induced by *IFNG* (interferon gamma) [14]. In studies performed on head and neck cancer samples, a positive correlation was found between methylation of the *DAPK1* gene and the presence of lymph node metastases, confirming the role of this protein in the dissemination of the tumor [15].

The glycoprotein E-cadherin is the main adhesion molecule of the epithelium, and a reduction or loss of its expression is frequently seen during carcinogenesis. It has been suggested that methylation of the *CDH1* gene in association with the loss of its expression may persist in invasive and metastatic lesions during the progression of cancer [16]. The *ADAM23* gene, a member of the ADAM protein family (ADAM, for “a disintegrin and metalloproteinase”), is located on chromosome 2q33 and encodes ADAM domain 23; it possesses a potent adhesion domain and is involved in cell–cell and cell–matrix interactions. Members of this family are membrane-anchored proteins structurally related to snake venom disintegrins, and have been implicated in a variety of biological processes involving cell–cell and cell–matrix interactions, including fertilization, muscle development and neurogenesis [17]. It has been shown that advanced-stage primary breast tumors present with a high degree of methylation in the *ADAM23* gene [18].

Our objective was to analyze the methylation pattern of the promoter region of genes *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23* in DNA samples from 43 head and neck tumors.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Forty-three tumor samples were collected from patients diagnosed with head and neck tumors at the Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute in São Paulo, Brazil. Of these patients, 32 were male, and 11 were female; 95% were smokers and 70% consumed alcohol. In terms of staging, 30 patients had stage T4 tumors, 22 of them with lymph node involvement; 9 patients were in stage T3, of whom 1 had lymph node involvement; and 4 patients were in stage T2, one of them with lymph node involvement. No long-distance metastases were observed in any of the tumors. Fresh samples were obtained from surgical resection

of head and neck tumors: 30% from the oral cavity, 26% from the larynx, and 44% from the oropharynx (Table 1).

Research protocols and informed consent forms were reviewed and approved by the in-house Ethics Committee and by the National Committee of Ethics in Research. Demographic data, including age at diagnosis, gender, and use of alcohol and tobacco, were obtained from medical records. Tumor stage and grade were determined from surgical and pathology reports. Tumor stage classification was

Table 1
Demographic and clinical characteristics for 43 samples of head and neck cancer

Tumor	Age, years	Sex	Ethnicity	Tobacco?	Alcohol?	Localization ^a	TNM
T1	54	M	White	Yes	Yes	O	T4N1M0
T2	55	M	White	Yes	No	L	T3N0M0
T3	45	M	White	Yes	Yes	CO	T4N0M0
T4	42	M	White	Yes	Yes	L	T4N2AM0
T5	62	M	White	Yes	No	CO	T3N0M0
T6	73	M	White	Yes	Yes	L	T4N2BM0
T7	61	M	White	Yes	Yes	O	T3N0M0
T8	67	F	White	Yes	No	O	T3N0M0
T9	69	M	White	Yes	Yes	L	T3N0M0
T10	51	M	Black	Yes	No	O	T3N0M0
T11	58	F	White	Yes	Yes	L	T4N0M0
T12	74	F	White	Yes	No	O	T4N0M0
T13	52	M	Mulatto	Yes	Yes	O	T4N20M0
T14	57	M	White	Yes	Yes	CO	T4N3M0
T15	80	F	White	No	No	CO	T3N2M0
T16	54	M	White	Yes	Yes	O	T4N2M0
T17	68	M	White	Yes	Yes	O	T2N0M0
T18	58	M	White	Yes	No	O	T2N0M0
T19	50	M	White	Yes	Yes	L	T4N1M0
T20	56	M	White	Yes	Yes	L	T4N0M0
T21	72	M	White	Yes	No	CO	T2N0M0
T22	50	F	White	Yes	No	L	T4N1M0
T23	72	M	White	Yes	Yes	L	T4N0M0
T24	50	M	White	Yes	No	L	T4N1M0
T25	70	M	White	Yes	Yes	CO	T4N1M0
T26	49	M	White	Yes	Yes	O	T4N2aM0
T27	51	M	White	Yes	Yes	CO	T4N2bM0
T28	49	M	White	Yes	Yes	CO	T4N1M0
T29	55	M	White	Yes	Yes	L	T4N1M0
T30	51	M	White	Yes	Yes	O	T4N2BM0
T31	51	M	White	Yes	Yes	O	T4N3M0
T32	71	M	White	Yes	Yes	O	T2N2M0
T33	71	M	Black	Yes	Yes	CO	T4N0M0
T34	57	M	White	Yes	Yes	O	T4N2CM0
T35	69	M	Black	Yes	Yes	O	T4N1M0
T36	54	M	Black	Yes	Yes	CO	T4N3M0
T37	56	M	Black	Yes	Yes	CO	T3N0M0
T38	71	F	White	No	No	CO	T3N0M0
T39	57	M	White	Yes	Yes	O	T4N2CM0
T40	61	M	White	Yes	Yes	CO	T4N0M0
T41	78	F	White	Yes	Yes	O	T4N2CM0
T42	59	F	Black	Yes	No	O	T4N0M0
T43	60	F	Black	Yes	Yes	O	T4N2CM0

Abbreviations: CO, oral cavity; F, female; L, larynx; M, male; O, oropharynx; TNM, tumor–node–metastasis classification (with T for primary tumor, N for regional lymph nodes, and M for distant metastasis).

^a Primary localization of the tumor.

made according to the 1997 American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging criteria [19].

2.2. DNA collection and extraction from tumor samples

The tumor samples, collected after surgical resection, were stored in cryogenic tubes at -70°C . DNA extraction was performed according to the protocol of Sambrook et al. [20].

2.3. DNA conversion by sodium bisulfite

After the concentration of each DNA sample had been determined with spectrophotometry, 2 μg of DNA (per sample) was denatured by the addition of 1 μL herring sperm DNA (10 mg/mL) and 2 μL NaOH (3 mol/L) and then was heated to 50°C for 20 minutes. Next, the DNA was treated with a solution of 500 μL sodium bisulfite (2.5 mol/L)–hydroquinone (1 mol/L)–NaOH (2 mol/L) and was heated to 70°C during 3 hours in the dark. After this treatment, a Wizard clean-up kit (Promega) was used for purification of the DNA, according to the manufacturer's instructions. The purified DNA was precipitated with 75 μL ammonium acetate (5 mol/L), 350 μL of 100% frozen ethanol and 1 μL of 20% glycogen (20 mg/mL), and incubated at -20°C overnight. After precipitation, the DNA was centrifuged and dried at room temperature; finally, the DNA was resuspended with 50 μL of distilled, deionized water.

2.4. Methylation-specific polymerase chain reaction

After the conversion of the DNA, methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed, to analyze the methylation pattern of the chosen genes. In this study, the specific genes were *p14*, *p16*, *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23*. The primers used for each gene in the PCR reaction were specific for methylated and unmethylated DNA (Table 2).

Amplification reactions were performed in a final volume of 25 μL , using 0.24 mmol/L of dNTPs (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 2 mmol/L of MgCl_2 , $1\times$ PCR buffer without magnesium (Invitrogen), and 1 U platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Touch-down PCR conditions for the genes *p14*, *p16*, *CDH1*, and *DAPK1* were as follows: 95°C for 5 minutes, followed by 10 cycles at 94°C for 30 seconds, at the annealing temperature of each gene (Table 2) for 1 minute, 72°C for 1 minute; 10 cycles of 94°C for 30 seconds, the annealing temperature of each gene for 1 minute, 72°C for 1 minute, and 15 cycles of 94°C for 30 seconds, the annealing temperature of each gene for 1 minute, 72°C for 1 minute, with a final extension of 72°C for 7 minutes. The PCR conditions for gene *ADAM23* were as 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 45 seconds, 59°C for 45 seconds, and 72°C for 1 minute, with a final extension of 72°C for 5 minutes. The nested PCR technique was used only for the *p16* gene, according to the protocol of Kresty et al. [7].

The methylation pattern (i.e., detection of the methylated or unmethylated alleles) in the promoter region of the five genes was analyzed in three cell lines derived from colon cancer (HCT116, SW480, and DLD-1), one cell line derived from breast cancer (MCF-7), one cell line derived from lung cancer (H1299), and one from bladder cancer (HT1376). The methylation pattern in the promoter region of the *p14* gene was analyzed in SW480 (methylated control) and HCT116 (unmethylated control); for the *CDH1* gene, H1299 (methylated control) and HCT116 (unmethylated control) were used; for the *DAPK1* gene, MCF-7 (methylated control) and DLD-1 (unmethylated control) were used; and for the *ADAM23* gene, MCF-7 (methylated control) was used. The methylation pattern in the promoter region of the *p16* gene was analyzed using HCT116 (methylated control) and HT1376 (unmethylated control). The PCR products were added to an 8% polyacrylamide gel, to measure the size of the amplicons and to assess the methylation pattern of the genes in the tumor samples.

Table 2
Primer sequences used in methylation-specific polymerase chain reaction

Gene	Primer sequence		$T_{\text{anneal}}, ^{\circ}\text{C}$	Product size, bp	
	Methylated situation (5'–3')	Unmethylated situation (5'–3')		U	M
<i>ADAM23</i>	F ATTGTTTTTTGGTTAGAATGTCG R TAAAAAAAACACAAAAACCGAACG	F ATTGTTTTTTTGTAGAAATGTTG R TAAAAAAAACACAAAAACCAAACA	59	100	100
<i>DAPK1</i>	F GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC R CCCTCCCAAACGCGA	F GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT R CAAATCCCTCCCAAACACCAA	62–60–58	106	98
<i>CDH1</i>	F TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT R TAACTAAATTCACCTACCGAC	F TAATTTAGGTTAGAGGGTTATTGT R CACAACCAATCAACACA	62–60–58	97	115
<i>p14^{ARF}</i>	F GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC R AAAACCCCTACTCGCGACGA	F TTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT R CAAAAAACCCCTCACTCACAACAA	65–63–61	132	122
<i>p16^{INK4a}</i>	F CGGGGAGTAGTATGGAGTCGGCGGC R GACCCCGAACCGCGACCGTAA	F TGGGGAGTAGTATGGAGTTGGTGGT R CAACCCCAAACCAACACATAA	64	81	81

References: *ADAM23*, unpublished data; *DAPK1*, *CDH1*, and *p14^{ARF}*, Zöchbauer-Müller et al., 2001 [21]; *p16^{INK4a}*, Kresty et al., 2002 [7].
Abbreviations: F, forward; M, methylated; R, reverse; T_{anneal} , annealing temperature; U, unmethylated.

2.5. Statistical analysis

McNemar's test and confidence for two proportions and Fisher's exact test were used to analyze the observed data. A P -value < 0.05 was considered significant.

3. Results

This study comprised samples from 43 patients diagnosed with head and neck cancer. First, an overall analysis of the tumors was made. The results showed that in 100% (43/43) of the tumors, the hypermethylation of the promoter region was present in at least one of the genes analyzed. In 20.9% (9/43) of the tumors, the hypermethylation of the promoter region was present in two of the genes analyzed, in 34.9% (15/43) of the tumors, the hypermethylation of the promoter region was present in three of the genes analyzed, and in 34.9% (15/43) hypermethylation was present in at least four of the five genes studied (Table 3).

The tumor suppressor gene *p14* was hypermethylated in 30% (13/43) of these samples. Hypermethylation of the *p16* gene was observed in 63% (27/43) of the tumors. In respect to genes *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23*, the frequencies of hypermethylation of the promoter regions were 81.3% (35/43), 88.3% (38/43), and 42% (18/43), respectively (Fig. 1). There was no statistically significant evidence of an association between the presence of hypermethylation in the promoter region of genes *p14*, *p16*, *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23* and advanced stages of the tumors. In the tumors that presented hypermethylation, metastatic lymph node involvement was observed for genes *p14*, *p16*, *CDH1*, *DAPK1*, and *ADAM23* in 53.8, 66.6, 52.6, 60, and 50% of the samples, respectively. There was statistically significant evidence ($P = 0.004$) of an association between the presence of hypermethylation in the promoter region of gene *p16* and the presence of lymph node involvement in the samples analyzed. In the overall analysis of the samples, no statistically significant association was found between the presence of aberrant methylation in the promoter region of genes *p14*, *p16*, *CDH1*, *DAPK1*, and *ADAM23* and the consumption of alcohol and tobacco by the patients.

After the overall analysis, the set of tumors was subdivided into regions (oropharynx, larynx, and oral cavity), and a new statistical analysis was made, to search for evidence of an association between the methylation pattern of the genes, the stage of the tumor, and the presence of lymph node metastases. In the oropharynx, statistically significant evidence was found of an association between the presence of hypermethylation in the promoter region of the *DAPK1* gene and the presence of lymph node involvement ($P = 0.036$) (Table 4). In the larynx, there was statistically significant evidence of an association between the presence of hypermethylation in the promoter region of genes *ADAM23* and stages T3 and T4 of the tumors ($P = 0.005$). In the oral cavity, there was no statistically significant evidence of an association between the presence of

Table 3

Methylation pattern of five genes in 43 tumor samples

Tumor	<i>p14</i>	<i>p16</i>	<i>DAPK1</i>	<i>CDH1</i>	<i>ADAM23</i>
T1	—	—	×	×	×
T2	—	×	×	×	×
T3	—	×	×	×	×
T4	—	×	×	×	—
T5	×	—	—	×	—
T6	—	×	×	×	—
T7	—	—	×	×	—
T8	×	×	—	—	—
T9	—	—	×	×	×
T10	—	—	×	×	×
T11	—	—	×	×	×
T12	×	×	—	×	—
T13	—	×	×	×	—
T14	×	×	—	×	—
T15	×	×	×	×	—
T16	×	×	×	×	×
T17	×	×	×	×	×
T18	—	—	×	×	—
T19	×	×	×	×	—
T20	—	—	×	×	—
T21	—	—	×	×	—
T22	—	—	—	×	—
T23	×	—	×	×	—
T24	×	×	×	×	—
T25	—	×	×	×	—
T26	—	×	×	×	—
T27	×	×	×	×	—
T28	×	×	×	×	×
T29	—	×	×	×	—
T30	—	×	×	×	×
T31	—	×	×	×	×
T32	—	×	×	—	—
T33	—	—	—	×	×
T34	—	×	×	×	×
T35	—	×	×	—	—
T36	—	—	×	—	×
T37	—	×	×	×	×
T38	—	×	×	×	—
T39	—	×	—	—	—
T40	×	—	×	×	×
T41	—	×	×	×	×
T42	—	×	—	×	—
T43	—	—	×	×	×

Legend: ×, methylated genes; —, unmethylated genes.

hypermethylation in the promoter region of genes *p14*, *p16*, *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23* and the clinical data analyzed.

4. Discussion

Methylation is the main epigenetic event in humans, and changes in the methylation pattern play an important role in tumorigenesis. Feinberg [22] hypothesized that, according to the epigenetic hypothesis, epigenetic modification can play a critical role in cancer initiation and also in cancer progression. In addition to contributing to carcinogenesis, there is growing evidence that epigenetic changes are specifically associated with activation or silencing of genes. In

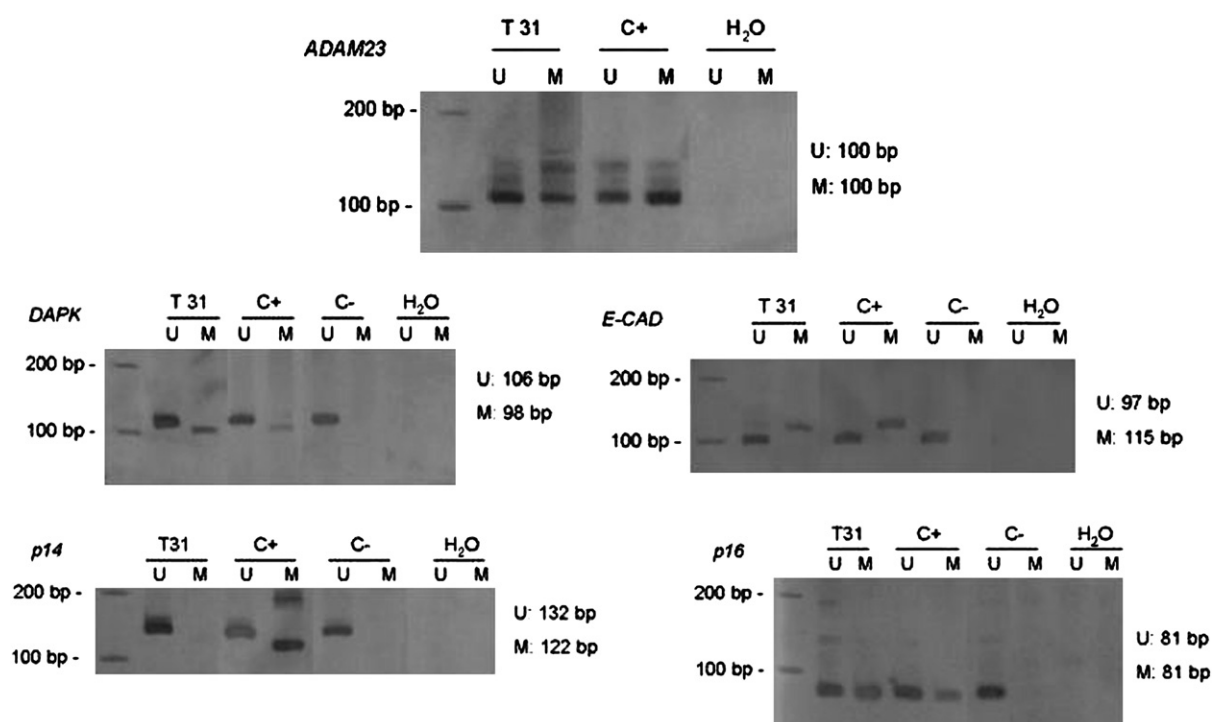


Fig. 1. Representative examples of methylation-specific polymerase chain reaction for genes *CDKN2A* (analyzed separately as *p14* and *p16*), *DAPK1*, *CDH1* (alias *E-CAD*), and *ADAM23*. Tumor (T31) of head and neck cancer patient. Lanes U and M correspond to unmethylated and methylated reactions, respectively. In each case, C– indicates DNA from a cell line with an unmethylated promoter of the respective target gene, C+ indicates DNA from cell line with methylated promoter of the respective target gene, and H₂O indicates negative PCR control. On the left: molecular weight marker; on the right: the size of each PCR product, unmethylated and methylated.

particular, hypermethylation of the CpG islands, normally unmethylated in the promoter region of many tumor suppressor genes, correlates with a loss of expression [23].

Development of the sensitive methylation-specific PCR technique has simplified the study of genes inactivated by

hypermethylation of the promoter region in human cancer. The advantages of the methylation-specific PCR technique are its simplicity, specificity for each gene, and its sensitivity, enabling the detection of one methylated gene copy in 1,000 unmethylated copies [24].

Table 4

Percentage of hypermethylation in *p14*, *p16*, *DAPK1*, *CDH1*, and *ADAM23* genes according to subsite, stage, and lymph node involvement of head and neck tumors used for analysis

Gene, by subsite	Stage, no. (%)				Lymph node involvement, no. (%)		
	T2	T3	T4	P-value	Positive	Negative	P-value
Oral cavity							
<i>p14</i>	0 (0)	2 (50)	4 (50)	nsf	4 (67)	2 (28)	0.17
<i>p16</i>	0 (0)	3 (75)	4 (50)	nsf	4 (67)	3 (43)	0.391
<i>DAPK1</i>	1 (100)	3 (75)	6 (75)	1.0	5 (83.3)	5 (71.4)	1.0
<i>CDH1</i>	1 (100)	4 (100)	7 (87)	nsf	5 (83)	7 (100)	nsf
<i>ADAM23</i>	0 (0)	1 (25)	5 (62)	nsf	2 (33)	4 (57)	0.391
Oropharynx							
<i>p14</i>	1 (33)	1 (33)	2 (15)	nsf	1 (8)	3 (43)	0.075
<i>p16</i>	2 (67)	1 (33)	11 (85)	nsf	10 (83)	4 (57)	0.211
<i>DAPK1</i>	3 (100)	2 (67)	11 (85)	0.7	12 (100)	4 (57)	0.036
<i>CDH1</i>	2 (67)	2 (67)	10 (77)	nsf	9 (75)	5 (71)	0.865
<i>ADAM23</i>	1 (33)	1 (33)	7 (54)	nsf	7 (58)	2 (28)	0.21
Larynx							
<i>p14</i>	—	0 (0)	3 (33)	1.0	2 (33)	1 (20)	1.0
<i>p16</i>	—	1 (50)	5 (55)	1.0	5 (83)	1 (20)	0.08
<i>DAPK1</i>	—	2 (100)	8 (89)	1.0	5 (83)	5 (100)	1.0
<i>CDH1</i>	—	2 (100)	9 (100)	1.0	6 (100)	5 (100)	1.0
<i>ADAM23</i>	—	2 (100)	1 (11)	0.005	0 (0)	3 (60)	0.061

Abbreviation: nsf, insufficient data for inference statistics.

Transcriptional silencing of multiple genes by hypermethylation of their CpG islands in the promoter region has been observed in squamous cell carcinomas in the head and neck region, including the mouth [25]. The frequency of methylation of the promoter region of genes *p16*, *p14*, *CDH1*, and *DAPK1* has been observed in head and neck cancer samples in 27% to 50% [12–14,26], 14% to 43.8% [9,27], 64% to 94.4% [16,28,29], and 7 to 68.3% [15,25,27,30] of cases, respectively. These findings are consistent with the methylation prevalence of the majority of the genes analyzed in this study. In our tumor samples, genes *p16* and *DAPK1* presented a greater frequency of methylation of the promoter region than reported in previously published studies. This may be due to differences in the histological characteristics of the samples.

We found statistically significant evidence of an association between the presence of hypermethylation in the promoter region of gene *DAPK1* and the presence of lymph node involvement in the oropharynx tumors analyzed ($P = 0.036$). These data corroborate those of Sanchez-Cespedes et al. [15], who found a positive correlation between methylation of *DAPK1* and the presence of lymph node metastasis in samples of head and neck cancer, supporting a role for the DAPK1 protein in tumor dissemination. Death-associated protein kinase 1 is a positive mediator of γ -interferon-induced programmed cell death [31]. The DAP-kinase protein is a calcium/calmodulin-dependent enzyme that phosphorylates serine/threonine residues. This protein has been classified as a positive mediator of apoptosis induced by IFN- γ . DAP-kinase expression is frequently lost in highly metastatic murine lung tumors as compared to their low-metastatic counterparts. In addition, restoration of DAP-kinase protein to physiological levels in highly metastatic Lewis carcinoma cells suppressed their ability to form metastases [32].

Hypermethylation of the gene *ADAM23* was found in our head and neck cancer samples (to our knowledge, the first such finding). Hypermethylation of this gene was present in 18 of the 43 of the tumor samples (42%), and in the larynx we observed significant evidence of an association between the presence of hypermethylation in the promoter region of the *ADAM23* gene and stages 3 and 4 of the tumors ($P = 0.005$), suggesting an important role of a member of the ADAM family in head and neck carcinogenesis. Costa et al. [18] also observed a strong association between hypermethylation of the promoter region of the *ADAM23* gene and advanced-stage breast cancer. These researchers corroborate the hypothesis of Takada et al. [33], that the loss of *ADAM23* is likely to play an important role with regard to cell–cell and cell–extracellular matrix interactions in gastric tissue as well, and might be essential for the progression of gastric cancer.

Cell–cell contact can sometimes inhibit growth (contact inhibition of growth), especially in normal cells. Hypermethylation of the *ADAM23* gene could lead to tumor progression, because the neoplastic cells would lose the contact

inhibition. As a consequence, these cells would proliferate in an uncontrolled manner; once the proliferation of most cancer cells is no longer sensitive to density-dependent inhibition, a permissive environment for cell proliferation is created [34].

We observed a correlation between the hypermethylation of the promoter region of *DAPK1* and *ADAM23* and the progression of head and neck cancer, but further studies are necessary for the validation of these genes as methylation markers for head and neck cancer. DNA methylation is the only epigenetic mark preserved in genomic DNA isolated from tumors or biopsies. In theory, an enormous amount of information can be encoded by DNA methylation patterns [35]. DNA methylation markers have obvious applications in diagnostics, but can also contribute indirectly to therapeutics as predictors of response to therapy. Early detection of cancer will allow therapeutic interventions to inhibit further development of the disease, and such information could also be used in the development of cancer prevention strategies.

References

- [1] Smiraglia DJ, Smith LT, Lang JC. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Med Genet* 2003;40:25–33.
- [2] Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000;36:2294–300.
- [3] Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of *p14^{ARF}* is independent of *p16^{INK4a}* methylation and *p53* mutational status. *Cancer Res* 2000;60:129–33.
- [4] Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. [Comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:392–4.
- [5] Smiraglia DJ, Plass C. The study of hypermethylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. *Oncogene* 2002;21:5414–26.
- [6] Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3:253–66.
- [7] Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, Weghorst CM. Alterations of *p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}* in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 2002;62:5295–300.
- [8] Quelle DE, Zindy F, Ashmund RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the *INK4a* tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995;83:993–1000.
- [9] Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the *p14^{ARF}*, *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2001;37:498–504.
- [10] Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. *INK4a-ARF* alterations and *p53* mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch* 2002;441:133–42.
- [11] Miracca EE, Kowalski LP, Nagal MA. High prevalence of *p16* genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer* 1999;81:677–83.
- [12] Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of *p16^{INK4a}* gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2001;163:221–8.

- [13] Huang MJ, Yeh KT, Shih HC, Wang YF, Lin TH, Chang JY, Shih MC, Chang JG. The correlation between CpG methylation and protein expression of *p16* in oral squamous cell carcinomas. *Int J Mol Med* 2002;10:551–4.
- [14] Reddy AN, Jiang WW, Kim M, Benoit N, Taylor R, Clinger J, Sidransky D, Califano JA. Death-associated protein kinase promoter hypermethylation in normal human lymphocytes. *Cancer Res* 2003;63:7694–8.
- [15] Sanchez-Céspedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:892–5.
- [16] Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002;94:386–92.
- [17] UCSC Genome Bioinformatics Group. Human gene ADAM23 description and page index [Internet]. May 2004 build. Available at: http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?org=Human&hg_gene=NM_003812&hg_chrom=none&hg_type=known. Accessed December 4, 2005.
- [18] Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, Ierardi DF, Pires LC, Sasahara RM, Sogayar MC, Zanata SM, Mackay A, O'Hare M, Soares F, Simpson AJ, Camargo AA. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene* 2004;23:1481–8.
- [19] Fleming ID, Phillips JL, Menck HR, Murphy GP, Winchester DP. The National Cancer Data Base report on recent hospital cancer program progress toward complete American Joint Committee on Cancer/TNM staging. *Cancer* 1997;80:2305–10.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [21] Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249–55.
- [22] Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004;14:427–32.
- [23] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141–96.
- [24] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Hamilton SR, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821–6.
- [25] Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004;40:145–53.
- [26] Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. The *p16* (*CDKN2a/INK4a*) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003;16:944–50.
- [27] Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, Kohama G, Tokino T. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3164–71.
- [28] Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:667–73.
- [29] Yeh KT, Shih MC, Lin TH, Chen JC, Chang JY, Kao CF, Lin KL, Chang JG. The correlation between CpG methylation on promoter and protein expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:3971–5.
- [30] Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter hypermethylation patterns of p16, O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:939–42.
- [31] National Center for Biotechnology Information. DAPK1 death-associated protein kinase 1 [*Homo sapiens*] [Internet]. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=1612. Accessed December 7, 2005.
- [32] Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach I, Kimchi A. DAP-kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997;390:180–4.
- [33] Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F, Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J. *ADAM23*, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene* 2005;24:8051–60.
- [34] Kramer RH, Shen X, Zhou H. Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:35–45.
- [35] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163–7.

The Prevalence of Human Papillomavirus in the Oropharynx in Healthy Individuals in a Brazilian Population

Patrícia Rossi do Sacramento,¹ Erica Babeto,¹ Jucimara Colombo,¹ Maurício José Cabral Ruback,² Jane Lopes Bonilha,² Atílio Maximino Fernandes,² João Simão Pereira Sobrinho,³ Fátima Pereira de Souza,⁴ Luisa Lina Villa,³ and Paula Rahal^{1*}

¹Departament of Biology, UNESP, São Paulo State University, IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

²College of Medicine, FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

³Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Microbiology, Institute of Science Biomedical, USP-SP, Laboratory of Virology, São Paulo, São Paulo, Brazil

Oncogenic human papillomavirus (HPV), a causative agent of uterine cervical cancer, has also been detected in head and neck squamous cell cancers, especially in squamous cell carcinomas of the tonsils. However, the true HPV prevalence in normal and neoplastic oropharyngeal mucosa remains uncertain. To determine the prevalence of HPV DNA in normal oropharyngeal mucosa of cancer-free individuals, a study was carried out on 50 Brazilian subjects. PCR was performed to identify HPV DNA in samples from four sites in the oropharynx (tonsils, soft palate, base of the tongue, and back wall of the pharynx). For amplification of the HPV DNA, MY09/11 consensus primers were used, and specific genotypes were identified by dot-blot hybridization or cloning and sequencing. HPV DNA was present in 14.0% of the individuals, and the identified genotypes were 16, 18, 52, and 61. All these types are considered high-risk (HR) HPV. The tonsils and the soft palate were the sites with the highest HPV prevalence. This study shows the prevalence of HR HPV in the oropharynx of normal individuals. However, the prevalence of HPV is still unclear, and if HPV infection in a healthy it is not known individual predisposes to HPV-associated disease such as oropharyngeal cancer. Thus, it is important to assess the prevalence of HPV in cancer-free individuals, in order to compare it with the HPV prevalence in oropharyngeal carcinomas and to attempt to determine the true role of HPV in the development of head and neck squamous cell cancers. **J. Med. Virol. 78:614–618, 2006.**

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HPV; head and neck squamous cell cancers; cancer-free individuals; oropharynx

INTRODUCTION

Head and neck cancer is a major health problem worldwide that accounts for approximately 500,000 new cases every year [Blons and Laurent-Puig, 2003]. Age-adjusted incidence and mortality rates increase with age and are almost three times higher in males than in females [Ries et al., 2002]. Smoking and drinking have been well documented as risk factors for most cases of head and neck squamous cell carcinoma [Blot et al., 1988]. Some oncogenic types of the human papillomavirus (HPV) have been found in the oral cavity and oropharynx of cancer-free adults [Kreimer et al., 2004] and in cancer biopsy specimens from head and neck squamous cell carcinoma patients [Herrero et al., 2003; Smith et al., 2004a].

The HPV is a small DNA tumor virus with a double-stranded circular DNA genome enclosed in an icosahedron-shaped protein capsid [zur Hausen, 2002]. HPV can cause different types of warts, genital condylomas, and laryngeal papillomas, and its association with sexually transmitted genital lesions is becoming more common [Reeves et al., 1994]. Approximately one-third of the 120 known HPV types infect regularly the genital tract. Certain HPV types, including HPV 16, 18, and others, are associated with an increased risk of cervical

Abbreviations: HPV, human papillomavirus; HR, high-risk; LR, low-risk; ND, not detected.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*Correspondence to: Paula Rahal, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. E-mail: rahalp@yahoo.com.br

Accepted 12 January 2006

DOI 10.1002/jmv.20583

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

malignancy and are, therefore, known as oncogenic or high-risk (HR) types. Other types, such as HPV 6, cause genital warts and low-grade cervical dysplastic lesions and are known as non-oncogenic or low-risk (LR) types, since they are rarely found as solitary isolates in genital-tract malignancies [Brown et al., 2005].

HPV DNA has been identified in primary tumors of the tonsils [Snijders et al., 1992; Paz et al., 1997], larynx, hypopharynx [Clayman et al., 1994], oral cavity [Kashima et al., 1990], tongue [De Villiers et al., 1985], nasopharynx [Hording et al., 1994], in cell lines derived from a variety of head and neck carcinomas [Bradford et al., 1991], and in inverted papillomas that have progressed to squamous cell carcinoma [Beck et al., 1995]. Precancerous lesions [Fouret et al., 1995] and metastatic lymph nodes [Miller and White, 1996; Paz et al., 1997] have also been shown to contain DNA of the same HPV type as the primary tumor, supporting the involvement of HPV in the development of squamous cell carcinoma. Among head and neck squamous cell cancer biopsies, the true prevalence of HPV DNA remains uncertain; however, there are studies which estimated that up to 60% of head and neck squamous cell cancers may be HPV-positive [Herrero et al., 2003; Smith et al., 2004b].

The oropharynx is covered by an epithelium with characteristics that are similar to those of the genital region, and both are exposed to microorganisms, some of which could be potentially carcinogenic [Lakshmi et al., 1993]. Considering that in the genital region, this virus is implicated in the development of uterine cervical cancer, it is possible that such a link could also be present in relation to head and neck cancer. Therefore, it is important to determine the frequency of this virus in the oropharynx and its possible relationship with the presence of a malignant neoplasm in this anatomical site [Lazzari et al., 2004]. The aim of the present study was to determine the prevalence of HPV DNA in four sites of the oropharynx (tonsils, soft palate, base of the tongue, and back wall of the pharynx) in cancer-free individuals.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

The study sample consisted of 50 cancer-free individuals, with no signs of neoplasia of the upper airways or any other pathology of the oropharynx (29 women and 21 men, mean age 28 years; range 16–52 years). These individuals underwent different surgeries at Hospital de Base, in São José do Rio Preto, SP, Brazil. The study material was obtained under general anesthesia, after the surgical procedure. Individual scrapes were collected from four different sites of the oropharynx: right and left palatine tonsils, soft palate, base of the tongue, and back wall of the pharynx.

Prior to surgery, the subjects answered a questionnaire for the assessment of epidemiologic variables and signed an informed consent form, after learning about the procedure and objective of the study. Information

regarding age, smoking, and drinking was obtained by personal interview.

The human subject protocol was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine (FAMERP).

DNA Extraction

Oropharyngeal specimens from tonsils, soft palate, base of the tongue and back wall of the pharynx were collected with a cytobrush and immersed in 2 ml TE buffer (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM). The samples were stored at -20°C until the time of DNA extraction. DNA was isolated from the oropharyngeal specimens according to the method of Sambrook et al. (1989).

HPV Detection and Typing

To determine the quality of DNA extraction, all samples ($n = 200$) were submitted to PCR amplification of the 268-bp β -globin gene, using the G73/G74 primers, and the samples which were positive for the β -globin gene were later processed to identify HPV DNA [Greer et al., 1991].

The presence of HPV DNA was determined by PCR, using the MY09/11 primers, which amplify a 450-bp fragment of the HPV L1 region. The reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel containing 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide. Ultraviolet transillumination was used to identify the expected 450-bp HPV fragment [Manos et al., 1989].

HPV typing was done by dot-blot hybridization. The 20 corresponding probes were used to identify 19 different HPV types and 1 generic probe that is degenerated and detects most of the HPVs. Each dot-blot membrane included several negative and positive controls for HPV types, as well as PCR products. The membrane was hybridized overnight at 55°C in $6\times$ standard saline citrate (SSC), $10\times$ Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecylsulfate (SDS), and 200 $\mu\text{g/ml}$ salmon sperm DNA with HPV HR probes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 58) and LR probes (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44 e 54) labeled with γ - $[^{32}\text{P}]\text{dATP}$. After hybridization, the unbound probe was removed from the membrane by one 10-min wash of $2\times$ SSC and 0.1% SDS at room temperature and two 10-min washes of the same solution at 56°C . The membrane was exposed to X-ray film at -70°C for 48 hr.

The samples that hybridized only to the generic probe were typed further by direct DNA sequencing. Sequencing was performed by Dye Termination (Applied Biosystems) on a DNA sequencer (ABI PRISM377, Applied Biosystems). The nucleotide sequences were compared with GenBank sequences using the Nucleotide BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

RESULTS

Fifty cancer-free volunteers were selected at random and recruited at the Hospital de Base, in São José do Rio Preto, SP, Brazil. The cohort included different

TABLE I. HPV Detection in 173 Samples Analyzed by Oropharyngeal Site

Site	Total number of samples	HPV negatives % (n)	HPV positive % (n)
Tonsils	39	20.8 (36)	1.7 (3)
Soft palate	47	25.4 (44)	1.7 (3)
Base of tongue	43	23.7 (41)	1.2 (2)
Pharynx back wall	44	24.9 (43)	0.6 (1)
Total	173	94.8 (164)	5.2 (9)

generations and both genders. With the purpose of analyzing whether there were any abnormalities in the oropharyngeal mucosa, a cytopathological examination was undertaken of 200 samples collected from the 50 subjects. All the results were negative for neoplastic cells.

Twenty-seven of the 200 oropharynx samples, which were β -globin-negative, were excluded from analysis, due to their failure to amplify. Thus, 173 extracted DNA samples were included in the study.

Of the 173 samples examined, 9 (5.2%) were HPV-positive and 164 (94.8%) were HPV-negative. The HPV-positive samples showed a prevalence of 1.7% in the tonsils, 1.7% in the soft palate, 1.2% in the base of the tongue, and 0.6% in the back wall of the pharynx (Table I). Viral typing showed that 5 out of the 173 samples hybridized with the specific probes for HPV types 16, 18, and 52, and 4 hybridized with the generic probe. The samples that hybridized only with the generic probe were cloned and sequenced. Two samples had not enough DNA for cloning and sequencing, and could therefore not be typed. The other two samples were sequenced and both were found to be HPV type 61. All the HPV types detected in the study are considered HR (Table II).

Of the 50 subjects studied, 7 (14.0%) were HPV-positive; 2 were positive for HPV type 61, 1 was positive for HPV type 16, 1 for HPV type 18, and 1 for HPV type 52. Of these 7 HPV-positive subjects, 5 were positive at one site (1 HPV 18 and 2 HPV 61), and 2 were positive at two sites of the oropharynx (1 HPV 16 and 1 HPV 52). Of the five individuals, which were positive at one site of the oropharynx, one was positive at the base of the tongue,

two were positive at the tonsils, and the others were positive at the soft palate. Of the two subjects with two positive sites, one was positive at the soft palate and the base of the tongue, and the other was positive at the tonsils and at the back wall of the pharynx (Table III). The tonsils and the soft palate were the most HPV-prevalent sites, as they were present in three individuals each.

Of the HPV-positive subjects, 52.1% were women and 42.9% men; 14.3% were smokers, and 85.7% non-smokers. The average age was 25.4 years. As for alcohol abuse, 71.4% were drinkers and 28.6% were not drinkers. Regarding sexual behavior, 14.3% had practiced oral sex, and 57.1% had had 1–4 sex partners.

DISCUSSION

The etiology of head and neck squamous cell carcinoma is multifactorial. Oncogenic HPV, a causative agent in uterine cervical cancer, has also been repeatedly detected in head and neck squamous cell carcinoma, especially in squamous cell carcinomas of the tonsils [Dahlstrand and Dalianis, 2005; Szentirmay et al., 2005].

A number of studies have addressed the prevalence of HPV DNA in malignant lesions of the oral cavity [Sand et al., 2000; Giovannelli et al., 2002; Ha et al., 2002; Correnti et al., 2004; Kurose et al., 2004]. However, HPV DNA has also been found in normal oral mucosa [Miller and Johnstone, 2001; Kurose et al., 2004]. Therefore, some researchers have attempted to determine the prevalence of HPV infection in healthy oral mucosa of cancer-free individuals. The estimates of HPV prevalence vary, depending on the studied population, the samples and the methods used. That is why geographic location and study size were investigated as possible sources of variability [Eike et al., 1995; Bouda et al., 2000; Kreimer et al., 2005].

Some studies have attempted to find the prevalence of HPV infection in oropharyngeal carcinomas using the case-control method [Herrero et al., 2003; Smith et al., 2004a or not [Lindel et al., 2001; Smith et al., 2004b]. Thus, the HPV prevalence in the oropharynx of normal individuals remains uncertain, just as the actual prevalence of HPV DNA among head and neck squamous cell carcinomas biopsies.

This study is the first to be conducted in Brazil to determine the presence of HPV DNA in the oropharynx of cancer-free individuals. HPV DNA was detected in 14.0% of the subjects studied. This finding is consistent with other studies, which reported a prevalence of DNA HPV in normal oral mucosa ranging from 0% to 20% in healthy individuals, especially of HPV types 16 and 18 [Miller and Johnstone, 2001; Summersgill et al., 2001; Giovannelli et al., 2002; Nagpal et al., 2002].

The prevalence of HPV in healthy individuals can vary according to the site and population studied [Ha et al., 2002]. Kurose et al. [2004] found 0.6% HPV DNA in normal oral mucosa of subjects from Japan. Yet, Cortezzi et al. [2004] detected HPV DNA in 10.6% of

TABLE II. Oropharyngeal Site and HPV Types in the Samples HPV Positive

Samples	Site	HPV type—HR
1	Base of tongue	18
2	Base of tongue	52
3	Pharynx back wall	16
4	Soft palate	52
5	Soft palate	61
6	Soft palate	ND ^a
7	Tonsils	16
8	Tonsils	61
9	Tonsils	ND ^a

^aND, not detected.

TABLE III. HPV Type of the Individuals Positive by Oropharyngeal Site

Number of the site HPV positive	Number of the individuals positive %	Site	HPV type—HR (n)			
			16	18	52	61
1	1	Base of tongue soft palate tonsils		1		
	2					1
Total ^a	2		0	1	0	2
2	1	Base of tongue and soft palate pharynx back wall and tonsils			1	
	1		1			
Total			1	0	1	0

^aIn two individuals, the specimens were not genotyped.

normal oral mucosa samples from control subjects in Brazil. All the control samples analyzed were collected from the oral cavity and not from the oropharynx. It is, therefore, important to study the normal oropharyngeal mucosa, to compare the HPV prevalence in oropharyngeal carcinomas and in normal cells, in order to determine the true role of HPV infection at this site in carcinomas.

All the HPV-positive individuals were positive for HR types. HR types of HPV are a causative agent of uterine cervical cancer, and molecular biological approaches have provided evidence for specific mechanisms [zur Hausen, 1999]. An increasing number of studies have suggested that HR types of HPV play an etiological role in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma, particularly in oropharyngeal carcinomas and especially in tonsillar malignancies [Gillison and Shah, 2001; Miller and Johnstone, 2001; Giovannelli et al., 2002; Correnti et al., 2004; Smith et al., 2004b].

HPV type 61 was found in two individuals, followed by HPV types 16, 18, and 52, present in one subject each. Some types of HR HPV that infect the genital tract, like the HPV types found in this study, can also be found in the oral cavity of cancer-free individuals [Kreimer et al., 2005]. The immunological response may also differ between oropharynx and other head and neck sites, possibly affecting HPV type-specific prevalence [Kreimer et al., 2005].

In the present study, the tonsils and the soft palate were the sites with the greatest prevalence of HPV, as it was present in three individuals (42.9%). Studies have indicated that the tonsils have the highest HPV prevalence (60%). A hypothesis to explain this finding may be that the complicated juxtaposition between squamous cell epithelium and lymphatic tissue in the tonsils may share properties similar to the squamous-columnar junction of the cervix uteri, where the majority of HPV-associated cancers of the female genital tract arise, despite the almost ubiquitous presence of HPV infection in the vagina and vulva of sexually active women [Winer et al., 2003].

In conclusion, this study demonstrates the prevalence of HPV DNA in the oropharynx of cancer-free individuals. Although it is not clear whether infection in a healthy individual predisposes the person to later arising HPV-associated diseases such as oropharyngeal and tonsillar cancer, it seems that the tonsils act as a reservoir for these HPVs. Therefore, if the infection persists in cancer-free individuals, it is important to determine the factors associated with the progression from HPV infection to dysplasia and malignancy.

REFERENCES

- Beck JC, McClatchey KD, Lesperance MM, Esclamado RM, Carey TE, Bradford CR. 1995. Human papillomavirus types important in progression of inverted papilloma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113:558–563.
- Blons H, Laurent-Puig P. 2003. TP53 and head and neck neoplasms. *Hum Mutat* 21:252–257.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48:3282–3287.
- Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington CS, Kittas C. 2000. “High risk” HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 13:644–653.
- Bradford CR, Zacks SE, Androphy EJ, Gregorie L, Lancaster WD, Carey TE. 1991. Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 104:303–310.
- Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, Juliar BE, Breen TE, Fortenberry JD. 2005. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 191:182–192.
- Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, El-Naggar AK, Grimm EA. 1994. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120:743–748.
- Correnti M, Rivera H, Cavazza ME. 2004. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Dis* 10:163–166.
- Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PMP, Freitas SEN, Góis-Filho JF, Fukuyama EE, Cordeiro JA, Cury PM, Maniglia JV, Villa LL, Tajara EH, Rahal P. 2004. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 150:44–49.
- Dahlstrand HM, Dalianis T. 2005. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in Tonsillar cancer. *Adv Cancer Res* 93: 59–89.

- De Villers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. 1985. Papilloma-virus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 36:575–578.
- Eike A, Buchwald C, Rolighed J, Lindeberg H. 1995. Human papillomavirus (HPV) is rarely present in normal oral and nasal mucosa. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 20:171–173.
- Fouret P, Martin F, Flahault A, Saint-Guily JL. 1995. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. *Diagn Oral Pathol* 4:122–127.
- Gillison ML, Shah KV. 2001. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: Mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 13:183–188.
- Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, Ammatuna P. 2002. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* 185:833–836.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviati NB, Manos M. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effect of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 95:117–124.
- Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, Califano JA. 2002. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 8:1203–1209.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaran P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S, IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. 2003. Human papilloma-virus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95:1772–1783.
- Hording U, Nielsen HW, Dagaard S, Albeck H. 1994. Human papillomavirus types 11 and 16 detected in nasopharyngeal carcinomas by the polymerase chain reaction. 1994. *Laryngoscope* 104:99–102.
- Kashima HK, Kutcher M, Kessiss T, Levin LS, de Villers EM, Shah K. 1990. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leuko-plakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99:55–61.
- Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, Shah KV, Gillison ML. 2004. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis* 189:686–698.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467–475.
- Kurose K, Terai M, Soedarsono N, Rabello D, Nakajima Y, Burk RD, Takagi M. 2004. Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 91–96.
- Lakshmi S, Asha Nair S, Radhakrishna Pillai M. 1993. Oral cancer and human papillomaviruses: Is there a link? *J Surg Oncol* 52:193–196.
- Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzeti MC. 2004. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 33:260–263.
- Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. 2001. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: A radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 92:805–813.
- Manos MM, Ting T, Right DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells Mol Diagnost Hum Cancer* 7:209–214.
- Miller CS, Johnstone BM. 2001. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982–1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:622–635.
- Miller CS, White DK. 1996. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82:57–68.
- Nagpal JK, Patnaik S, Das BR. 2002. Prevalence of high risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer* 97:649–653.
- Paz B, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. 1997. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Cancer* 79:595–604.
- Reeves WC, Gary HE Jr, Johnson PR, Icenogle JP, Brenes MM, de Britton RM, Dobbins JG, Schmid DS. 1994. Risk factors for genital papillomavirus infection in populations at high and low risk for cervical cancer. *J Infect Dis* 170:753–758.
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg LX, Edwards BK. 2002. SEER cancer statistics review, 1973–1999. Bethesda, MD: National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.3 p.
- Sand L, Jalouli J, Larsson P-A, Hirsch J-M. 2000. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res* 20:1183–1188.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. 2004. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 96:449–455a.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann KF, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. 2004. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 108:766–772b.
- Snijders PJF, Cromme FV, Van Den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow GB, Meijer CJLLM, Walbloomers JMM. 1992. Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* 51:845–850.
- Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. 2001. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:62–69.
- Szentirmay Z, Polus K, Tamas L, Szentkuti G, Kurcsics J, Csernak E, Toth E, Kasler M. 2005. Human papillomavirus in head and neck cancer: Molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer Metastasis Rev* 24:19–34.
- Winer RL, Lee SK, Hugles JP, Adam DE, Kiviati NB, Koutsky LA. 2003. Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 157:218–226.
- zur Hausen H. 1999. immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus geno-types. *Semin Cancer Biol* 9:405–411.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350.