



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

MARÍLIA BUENO SANTIAGO

**ANÁLISE DE PROTEOMA NO CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LARINGE**

CAMPINAS

2015

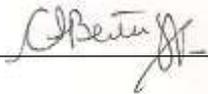
MARÍLIA BUENO SANTIAGO

**ANÁLISE DE PROTEOMA NO CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LARINGE**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Ciências Médicas na Área de concentração em Ciências
Biomédicas.**

ORIENTADOR: Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MARÍLIA BUENO SANTIAGO, E ORIENTADA PELA
PROF. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO.**



CAMPINAS

2015

Agência de fomento: CNPq
Nº processo: 157972/2011-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Sa59a Santiago, Marília Bueno, 1986-
Análise de proteoma no carcinoma de células escamosas de laringe /
Marília Bueno Santiago. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Carmen Silvia Bertuzzo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Proteômica. 2. Neoplasias. 3. Laringe. I. Bertuzzo, Carmen Silvia, 1963-
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Proteome analysis in laryngeal squamous cell carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Proteomics

Neoplasms

Larynx

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carmen Silvia Bertuzzo [Orientador]

Marilda de Souza Gonçalves

Camila Andréa de Oliveira

Andre Trevas Maciel Guerra

Gustavo Jacob Lourenço

Data de defesa: 30-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

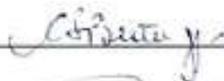
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARÍLIA BUENO SANTIAGO

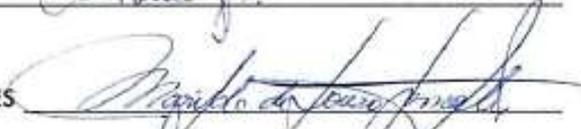
Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



2. PROF(A). DR(A). MARILDA DE SOUZA GONÇALVES



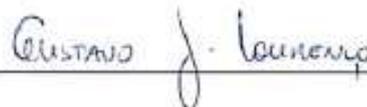
3. PROF(A). DR(A). CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA



4. PROF(A). DR(A). ANDREA TREVAS MACIEL GUERRA



5. PROF(A). DR(A). GUSTAVO JACOB LOURENÇO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30 de julho de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais que por mais quatro anos me apoiaram e me acompanharam nessa luta sem nunca desistir. Partilharam todos os meus sonhos, me apoiaram nos momentos difíceis e vibraram cada vez que eu atingia um objetivo, e tenho certeza que hoje mais que ninguém estão orgulhosos. Além de pais vocês foram parceiros, amigos, anjos... Eu só posso agradecer por tudo que vivi até agora e por todos os momentos que passamos juntos, pelos sorrisos, pelas broncas, pelas experiências... à vocês que merecem mais do que ninguém partilhar mais esse sonho!

AGRADECIMENTOS

Escrever uma tese não é só juntar um monte de palavras tiradas de artigos anteriormente lidos e conhecimentos adquiridos, escrever uma tese é passar dias e noites pesquisando e trabalhando focado no assunto, lendo livros, artigos, reportagens, entrevistas de especialistas da área, teses defendidas no mesmo assunto e juntando palavras que deem sentido ao seu trabalho e também a ciência.

Escrever uma tese é um trabalho que dura anos, um trabalho realizado diariamente como pedras que se colhe ao longo do caminho para construir um castelo. É querer colaborar com um universo onde um dia sua pequena contribuição fará parte de um estudo maior, é ter o sonho de que o seu simples trabalho possa colaborar com a ciência e ajudar na história de muitos.

Passar dias estudando, pesquisando, microdissecando em uma sala pequena e fria, passar horas no centro cirúrgico, tudo isso parece deprimente do ponto de vista emocional, mas para um pesquisador isso é a base de um processo que fortifica e dá animo, é o momento em que se tem certeza de que é isso que você quer para sua vida e que é a partir disso que você poderá seguir em frente e ajudar um paciente que dias depois de uma passagem difícil pelo hospital te encontra e abre um sorriso confiante, mesmo sabendo que a doença é grave e que o amanhã pode não chegar.

Mais do que fazer um doutorado e receber o título, nessa etapa da minha vida aprendi a olhar com o coração. Aprendi que reclamar de certas futilidades não fazem sentido quando você se depara com um ser humano que perdeu a fala, que perdeu um dos maiores sabores da vida e que passou a conviver com a dor e a angustia do amanhã. “Viver” o câncer de cabeça e pescoço foi muito mais do que pesquisar, foi aprender novos valores, rever conceitos e querer mais do que tudo encontrar algo novo que um dia alguém possa se beneficiar!

Depois de tanto ouvir o ditado, aprendi literalmente que um sorriso e um olhar valem muito mais que mil palavras...

Essa tese, mais do que qualquer coisa foi uma lição de vida!

Agradeço a todos que com palavras ou ações me ajudaram e construir essa pequena parte de um novo começo.

Agradeço a minha Orientadora Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, que me acompanha e me apoia há tanto tempo. Que ouviu cada uma das minhas palavras com carinho e paciência, que me pediu para parar e escutar com calma não deixando que os momentos de desespero tomassem conta da situação. A essa orientadora que antes de tudo é uma mãe de coração e uma amiga que tenho certeza que vou levar para a vida, agradeço com todo meu carinho e admiração por me proporcionar a chance de realizar uma pesquisa como essa. Agradeço pelos conhecimentos que nunca negou dividir, pelas horas dedicadas aos ensinamentos, pelas idas aos ambulatórios, pelos momentos de descontração, pelas risadas, pela alegria contagiante do nosso grupo que só acontecia na sua sala enquanto o resto do corredor estava em silêncio. Pelos momentos sérios, pelas decisões que sempre foram tomadas de comum acordo, pelos puxões de orelha que me fizeram crescer, pelas caronas de “longa distância” até o carro que estava logo ali e por saber que no dia seguinte você estaria lá, firme e forte para mais um dia de trabalho sério e também mais um dia cheio de sorrisos! E que se por algum motivo você não tivesse, a gente iria se falar pelo telefone, pela internet, ou mesmo na sua casa, a qual você sempre me recebeu com carinho! Com você nos últimos anos aprendi que mesmo com inúmeros problemas a vida é boa, é feliz e deve ser sempre levada com uma bela gargalhada, das quais nunca vou me esquecer! Afinal, no fim tudo dá certo!

Ao Dr. Chone, por me abrir as portas do Ambulatório de Otorrinolaringologia e do Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da Unicamp e me permitir fazer parte da equipe como se eu fosse um dos seus. Aprendendo, participando e questionando. Sempre pronto e disposto a colaborar com tudo! Dr. Chone, meu muito obrigado ao senhor que possibilitou a realização deste trabalho.

A Dra. Albina, que além de analisar pacientemente as lâminas de todos os meus pacientes coletados, ajudou na decisão sobre a qualidade e quantidade das amostras, e ainda tirou dúvidas e mais dúvidas sobre as lâminas, e gentilmente me cedeu não só o Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Unicamp, mas também as funcionárias Luzia e Cláudia, que me ajudaram na incansável batalha de fazer cortes milimétricos em lâminas para microdissecar! Com carinho e admiração por essa mulher discreta e de grande sabedoria.

A Dra. Ana, que hoje está empenhada em um Pós Doc no A. C. Camargo Cancer Center por toda a sabedoria passada e pelas infinitas horas na sala do microdissecador, me ajudando incansavelmente no corte das lâminas. Te agradeço pela disponibilidade e também pelas conversas divertidas e desabafos na sala fria! Além da sabedoria no tema, da vontade de me ensinar tudo que podia se tornou uma amiga muito querida.

A Cris, meu “cérebro computacional”, pela dedicação e carinho que tratou meus resultados, pela paciência e atenção que me deu. Pronta para me atender em todos os momentos e sempre empenhada em fazer o melhor, meu muito obrigada!

A Dra. Isabel, minha querida professora portuguesa, com quem tive o prazer de passar alguns meses e aprender muito! Agradeço por me abrir as portas do novo, me receber em seu laboratório, me ensinar muito e sem medo de dividir com uma “estranha” todo o conhecimento que tem, me acolher em um lugar desconhecido, me fazer sentir parte da sua equipe. A senhora me deu o carinho de uma mãe, os ensinamentos de um mestre e a alegria de uma criança. Permitiu que eu crescesse não só como profissional, mas também como ser humano. Com a senhora aprendi a ver o mundo com outros olhos. Nunca vou cansar de agradecer a oportunidade! Além disso, a senhora me deu a chance de conhecer pessoas incríveis, das quais jamais me esquecerei. A distância de um imenso oceano será sempre pequena para o amor que tenho a vocês!

A Ilda Patrícia, minha cópia européia, que me acolheu como irmã e me ensinou tudo que sabia e com quem espero desenvolver muitos e muitos trabalhos! A Mariana, que entre tantas coisas me abriu as portas da sua casa apenas para me deixar feliz e ir em busca da neve comigo! A Joana, louca por chocolates e sonhadora das praias brasileiras, que me fez sentir literalmente em casa, obrigada pela ajuda com o computador, pelo jantar de despedida, pelas risadas! A “Xana” e a Sofia, sempre quietinhas, mas com um belo sorriso no rosto e uma palavra de carinho na ponta da língua. Meninas vocês foram sensacionais!!

Agradeço muito ao meu grande amigo Miguel, o qual tenho a sensação de conhecer de vidas passadas, a felicidade e bondade em pessoa, brincalhão,

simpático, sorridente e sempre de bem com a vida... sem palavras meu amigo! A sua esposa Marta, uma moça nota mil, com um sorriso meigo e acolhedor e ao pequeno Manuel, que espero conhecer muito em breve! Agradeço ao Nuno, também conhecido como “paraguaio”, que me ensinou tudo com muita dedicação, além de se tornar um amigo muito querido. As meninas da secretaria, Sônia e Carla, a Ana, Alexandra, Patrícia e a todos do Laboratório de Citogenética e Genômica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que me acolheram com carinho!

Ao grupo Bertuzzo: Roby Will, Luciana Rezende e Fernando Marson, por estarem sempre presentes. Por me fazer acordar e ir para a Unicamp feliz, sabendo que ao chegar lá “nossa” sala estaria sempre iluminada. Não tenho dúvidas que essa é a sala mais feliz de todo o departamento! Obrigada pela paciência, pelos galhos quebrados, pela divisão de conhecimento e por estarem sempre prontos para compartilhar momentos difíceis e alegres, sorvetes, risadas, artigos e congressos!

Ao Ale, esse que merece um parágrafo único e especial, embora saiba que palavra nenhuma nesse mundo vai refletir o carinho e amizade que tenho por você, só posso te agradecer e agradecer e agradecer mil vezes. Você sabe que amigos de verdade estão presentes mesmo a quilômetros de distância e que é no coração que você pode refletir tudo. Saiba que sua amizade é eterna!

Ao Dr. Lucas e ao Dr. Thiago que tornaram minha vida no centro cirúrgico divertidíssima! Sempre com um sorriso no rosto, uma piadinha na ponta da língua, um novo ensinamento, e a mesma frase: “Outra vez você aqui... a gente não tem tudo isso de material para te dar não!”. Obrigada pela incansável luta por milímetros de material! Ao Dr. Pablo que mesmo com toda a seriedade de um médico era capaz de abrir um sorriso nos piores momentos e me ajudar com uma boa solução! A Dra. Raquel que se tornou uma grande companheira na minha jornada pela otorrino. Agradeço também ao Dr. Rodrigo, Dr. Henrique, Dr. Fernando, Dra. Milena, Dra. Guta e Dra. Patricia pela parceria e atenção. Além de todos os residentes e integrantes do ambulatório de otorrino, que me ajudaram durante minha passagem por lá.

A Graça, que mais uma recepcionista foi uma cúmplice durante minhas idas ao ambulatório.

Ao meu grande amigo Chico, conterrâneo, parceiro, inventor. Uma pessoa super de bem com a vida! Se existe alguém no mundo que gosta de viver e vive com prazer, essa pessoa é você. Mesmo nos momentos difíceis que passou no último ano, nunca te vi com o olhar baixo, sempre vi você buscando soluções e colocando a otorrino para funcionar a todo vapor! Todo conhecimento que tem para ajudar as pessoas, as invenções das quais vi e participei desde o início são fruto de alguém que tem alegria em viver! Seu lugar é ai na otorrino, esse ambulatório não é nada sem você! Te desejo todas as coisas boa existentes nesse mundo!

Ao Júlio, por ter a paciência de cortar minhas amostras minúsculas e aprender uma nova técnica somente para me ajudar!

Ao Fabrício, do SAME, funcionário sorridente, que por inúmeras vezes pegou a mesma pasta, que por inúmeras vezes me ajudou com as pesquisas no computador. Muito obrigada pela paciência e por ter tornado minhas horas de pesquisa felizes e organizadas!

A Dra. Adriana e a Romênia do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular que estão sempre apostos para apoiar.

A Faculdade de Ciências Médicas e Hospital de Clínicas da Unicamp, por me proporcionarem a oportunidade e os meios necessários para realizar a presente pesquisa.

A CNPq pelo financiamento, sem o qual não seria possível chegar a estes resultados.

A Deus, que para cada um se revela de uma maneira. Mas que para todos se expressa de forma concisa e coerente. Do meu modo, com muita fé, sei que fui iluminada e que meus passos foram guiados de modo que eu percorresse sempre o melhor caminho, muitas vezes cheguei a pensar que estava no caminho errado e mais uma vez o Senhor se mostrava presente. Passei pelo que precisava passar, tropecei onde foi necessário, mas venci mais uma etapa e cheguei a final!

A minha família, base de tudo! A minha vó que embora velhinha e um tanto confusa, sempre me ensina, a sua maneira, algo novo nessa vida. Ao meu tiozinho, Nilton Tadeu, que no último ano e nas últimas semanas me deu um susto enorme e ao mesmo tempo uma lição de vida. Me fez ver que um problema por mais grave que seja não tira a vontade de ninguém de viver, pelo contrário, me mostrou que quem gosta da vida, luta por ela com unhas e dentes! Tio, você não imagina o orgulho que tenho de você! A minha madrinha, Marta Cecília, destrambelhada, que com inúmeros problemas, vive como se ainda tivesse seus 15 anos, e sempre acha um motivo para sorrir. Faz uma falta inexplicável quando está longe, mas sei que está sempre aqui com o coração e os pensamentos. Ao meu padrinho, Paulo Sérgio, meu cozinheiro preferido, e o qual tenho uma incrível semelhança, esse que me tem como uma filha e me mimar mais que qualquer outra pessoa nesse mundo. Tio essa vitória também é sua! A minha madrinha agregada, Luciana, que torna os finais de semana muito mais doces! A Titi, Rosane Bueno, que dispensa comentários, é a engraçadinha da família! Sem vocês confesso que jamais seria feliz! E principalmente a minha mãe e ao meu pai. Mãe, você acompanhou e participou ativamente de cada segundo da minha vida, seja nos dias que passamos juntos ou nas infinitas horas no celular, você sabe de todas as minhas histórias, todas as minhas vitórias, mas principalmente sabe de todas as minhas angústias e lágrimas derramadas e nunca me permitiu desanimar. Pai, do seu jeito, eu sei o quanto você torce por mim e o quanto participa da minha vida. Sei que seus ouvidos ficam atentos para nossas conversas no celular e que por dentro fica sempre na torcida!! Sei que vocês são meus maiores fãs e podem ter certeza que isso é o que me dá força para conseguir resultados cada vez mais valiosos. Vocês são meus amores, não tenho palavras para descrever a gratidão e a felicidade por Deus ter me colocado justamente nessa família. Vocês são os melhores pais do mundo e merecem o agradecimento final dessa nossa conquista!

“Tua caminhada ainda não terminou...

A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória.

Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.

Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar a perfeição.

A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios precisa da água que rola e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram.

Olhes para trás...

Mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te”.

Charles Chaplin

RESUMO

O câncer de laringe representa cerca de 25% dos tumores malignos que acometem essa área e 2% de todas as doenças malignas. Ocorre em sua grande maioria em homens e é um dos mais comuns entre os tumores que atingem a região da cabeça e pescoço. Pode ocorrer em uma das três porções em que se divide o órgão: supraglote, glote e subglote, sendo que aproximadamente 2/3 dos tumores surgem na corda vocal verdadeira, localizada na glote, e 1/3 acomete a supraglote que se localiza acima das cordas vocais. O tipo histológico mais comum e que atinge mais de 90% dos pacientes, é o carcinoma de células escamosas (CEC) e é classificado de acordo com o grau de diferenciação celular. Estudos de expressão gênica têm sido realizados em vários tumores a fim de possibilitar o envolvimento de algumas proteínas na evolução tumoral, bem como determinar marcadores de gravidade. O objetivo deste trabalho foi estudar o contexto proteômico em células tumorais, displásicas e normais de pacientes com de CEC de laringe. Para isso após a coleta do material, foi realizada a confirmação histológica através de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina. A partir daí as células foram selecionadas e capturadas no Microdissecador a Laser da Zeiss. Em seguida foi realizada a análise proteômica, utilizando o espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap ETD acoplado ao cromatografo líquido nLCII ambos da Thermo. Os arquivos foram carregados no programa R para as análises subsequentes. Utilizando o pacote MSnbase foi feita a identificação e quantificação das proteínas e a identificação utilizou o arquivo uniprot_sprot.fasta, o método escolhido para quantificação foi o "SIN". Foi aplicado o teste-t pareado e como resultado final foram selecionadas as proteínas que possuíam p-valor menor que 0,01. Foram gerados clusters hierárquicos para demonstrar as proteínas hiper e hipoexpressas para cada grupo estudado. Sendo que após análise, encontramos como possíveis candidatas a marcadores biológicos do CEC de laringe as proteínas codificadas pelos genes *TYMP*, *TNC*, *RPLP1*, *MPO*, *ARHGEF1*, *QARS*, *SERPINC1*, *ATP5A1*, *AHNAK* e para a displasia de laringe as proteínas codificadas pelos gene *ZNF544*, *PP2D1*, *VCP*, *RAB12*, *ETFA*, *ZNF655*, *TUT1*, *XKRX*, *NOP58*, *INTS8*, *SARS*, *DKC1*, *ZNF470*, *SND1*, *LAS2*. Este trabalho é inédito já que buscou comparar as proteínas presentes nos tecidos tumoral, displásico e normal usando a microdissecção a laser, que permite que sejam selecionadas apenas grupos celulares de interesse, evitando a contaminação de outros grupos celulares.

Palavra chave: Proteômica, Neoplasias, Laringe.

ABSTRACT

Laryngeal cancer represents about 25% of malignant tumors that affect this area and 2% of all malignancies. It occurs mostly in men and is the most common among tumors that affect the region of the head and neck. It can occur in one of three parts which divides the laryngeal: supraglottis, glottis and subglottis, and approximately 2/3 of the tumors arise in the true vocal cord, located in the glottis and 1/3 involve the supraglottic which is located above the vocal chords. The most common histological type and achieves more than 90% of patients, is the squamous cell carcinoma (SCC). The SCC is classified according to the degree of cell differentiation. Gene expression studies have been conducted in various tumors to allow some of the proteins involved in tumor development as well as to determine severity markers. The objective of the present study was verify the proteomic context in tumor, dysplastic and normal cells in patients with laryngeal SCC. After to collect the sample, the cancer confirmation was made by histological confirmation using slides stained with hematoxylin-eosin. There after the cells were selected and captured in Zeiss Laser Mircodissection. Then carried the proteomic analysis using the LTQ Velos mass spectrometer Orbitrap ETD liquid chromatograph coupled to nLCII both from Thermo. The files were uploaded to the R program for subsequent analysis. Using MSnbase package the identification and quantification of proteins was made and used to identify the uniprot_sprot.fasta file, the method chosen for the measurement was the "SIN" .It was applied the paired t-test and the final result proteins were selected that had $p < 0.01$. Hierarchical clusters were generated to demonstrate higher and lower expression protein for each group studied. Being that after analysis, found as potential candidates for biological markers of laryngeal SCC proteins encoded by genes *TYMP*, *TNC*, *RPLP1*, *MPO*, *ARHGEF1*, *QARs*, *SERPINC1*, *ATP5A1*, *ATP5A1* and for the laryngeal dysplasia proteins encoded by the gene *ZNF655*, *TUT1*, *NOP58*, *INTS8*, *ETFA*, *RAB12*, *VCP*, *PP2D1*, *ZNF544*. This work is unprecedented since sought to compare the proteins present in the tumor, dysplastic and normal tissue using laser microdissection, which allows them to be selected only cell groups of interest, avoiding contamination of other cell groups.

Keywords: Proteomics, Neoplasms, Larynx.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da laringe humana.	27
Figura 2: Estágios de progressão do carcinoma de células escamosas.	27
Figura 3: Fluxograma do estudo proposto	55
Figura 4: Lâminas de microdissecção a laser. A – Tecido Normal, B – Tecido Displásico, C – Tecido Tumoral.	Erro! Indicador não definido.
Figura 5: Cluster hierárquico análise 1.	65
Figura 6: Cluster hierárquico análise 2.	66
Figura 7: Cluster hierárquico análise 3.	68
Figura 8: Cluster hierárquico análise 4.	69
Figura 9: Cluster hierárquico análise 5.	70
Figura 10: Cluster hierárquico análise 6.	72
Figura 11: Cluster hierárquico análise 7.	74
Figura 12: Cluster hierárquico análise 8.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de biomarcadores aprovados pelo FDA para o câncer. _____	42
Tabela 2: Amostras comparadas na análise 1. _____	63
Tabela 3: Amostras comparadas na análise 2. _____	65
Tabela 4: Amostras comparadas na análise 3. _____	67
Tabela 5: Amostras comparadas na análise 4. _____	69
Tabela 6: Amostras comparadas na análise 5. _____	70
Tabela 7: Amostras comparadas na análise 6. _____	71
Tabela 8: Amostras comparadas na análise 7. _____	72
Tabela 9: Amostras comparadas na análise 8. _____	74
Tabela 10: Proteínas encontradas nos diferentes tecidos estudados nas análises 4 e 5. _____	90

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Dados referentes as amostras utilizadas neste trabalho _____ 62
- Quadro 2:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas encontradas na análise 1, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 64
- Quadro 3:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 2, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 66
- Quadro 4:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 3, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 67
- Quadro 5:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 4, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 69
- Quadro 6:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 5, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 70
- Quadro 7:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 5, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 71
- Quadro 8:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 7, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 73
- Quadro 9:** Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 7, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada. _____ 75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Considerações iniciais	20
1.2 Epidemiologia do Câncer de Cabeça e Pescoço	22
1.3 Aspectos Clínicos	23
1.4 Fatores de Risco	28
1.4.1 Aspectos Ambientais	28
1.4.2 Aspectos Genéticos	31
1.5 Diagnóstico, tratamento e prognóstico	34
1.6 Proteoma	38
1.6.1 Biomarcadores identificados por proteômica para o câncer.	41
1.6.2 Possíveis Biomarcadores identificados por proteômica para o câncer de laringe.	47
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	52
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	53
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	53
3.2 Casuística	53
3.3 Métodos	54
3.3.1 Preparo das amostras	55
3.3.1.1 Análise Histológica	55
3.3.1.2 Preparo e montagem das lâminas para microdissecção a laser	56
3.3.2 Microdissecção a Laser	57
3.3.3 Preparação das amostras para análise no espectrômetro de massas	59
3.3.4 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)	60
3.3.5 Análise dos dados	60
3.3.6 Análise estatística	61
4. RESULTADOS	62
4.1 Análise proteômica baseada em espectrometria de massas associada à microdissecção a laser	62
4.2 Análise estatística	63

5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÃO	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. ANEXOS	122
8.1 Anexo 1: Estágio do Sistema TNM	122
8.2 Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	132
8.3 Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	135

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

O câncer é um dos problemas mais comum da medicina atual e as estatísticas mostram que atinge mais de um terço da população mundial, causando mais de 20% de mortes, sendo responsável por cerca de 10% do custo total da assistência médica populacional nos países desenvolvidos¹. Os tumores de cabeça e pescoço são responsáveis por 5% de todos os casos de câncer diagnosticados no mundo e afetam a qualidade de vida das pessoas acometidas, pois o tratamento na maioria das vezes é agressivo e mutilador^{2,3}.

A palavra “câncer” tem origem latina e significa “caranguejo”, teve essa denominação em analogia ao crescimento infiltrante nas células vizinhas comparado às pernas do crustáceo que as introduz na areia para se fixar e dificultar sua remoção^{3,4,5}.

As células humanas normais coexistem em estado harmônico de crescimento e função e são constituídas por três partes: a membrana celular, que é a parte mais externa; o citoplasma que é o corpo da célula e o núcleo, que contém os cromossomos. Os cromossomos são compostos por genes, que são os “arquivos” do corpo, guardam e fornecem instruções para a organização das estruturas, formas e atividades celulares no organismo. Toda a informação genética encontra-se inscrita nos genes, numa espécie de “memória química”, o chamado ácido desoxirribonucléico (DNA). É através do DNA que os cromossomos passam as informações para o funcionamento celular^{6,7}.

Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA dos genes, as chamadas mutações genéticas e essas células passam então a receber informações erradas, e sofrem uma sequência de alterações que podem gerar o tumor⁶.

A origem de um tumor, pode se dar por condições multifatoriais, sendo que os agentes causadores podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar o crescimento tumoral⁶. O desenvolvimento da maioria dos tumores malignos requer múltiplas etapas que ocorrem ao longo dos anos e pode

envolver dezenas e até centenas de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, dessa forma, alguns tipos de câncer podem ser minimizados pela eliminação da exposição aos fatores determinantes e se o potencial de malignidade for detectado antes de as células se tornarem malignas, ou em fase inicial da doença, o tratamento se torna mais fácil e eficaz, aumentando as chances de cura^{6,8}.

As células alteradas passam a se comportar de forma anormal, se multiplicam de maneira descontrolada e muito mais rápido que as outras, e passam a invadir os tecidos adjacentes. Tem a capacidade de formar novos vasos sanguíneos para garantir a nutrição das novas células e a atividade de crescimento, formando assim um tumor maligno. Além disso, essas células podem se desprender do tumor primário e migrar, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, mas podendo chegar a tecidos distantes e dando origem as metástases⁹.

Por outro lado, pode ocorrer também a formação de um tumor benigno, que significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida¹⁰.

Os diferentes tipos de câncer se referem aos diferentes tipos celulares encontrados no organismo, se, por exemplo, o câncer tem início em tecidos epiteliais (mucosa ou pele) ele é denominado carcinoma. Se, tem início em tecidos conjuntivos (osso, músculo ou cartilagem) é chamado de sarcoma⁶. Pode-se diferenciar os diversos tipos tumorais devido a velocidade de multiplicação celular e a capacidade de invadir tecidos e órgãos próximos ou distantes, causando metástases⁶.

O termo Câncer de Cabeça e Pescoço é definido por bases anatômicas e topográficas para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior, incluindo a cavidade oral, faringe, fossa nasal, seios paranasais e laringe^{2,11,12,13,14}.

Além disso, os fatores prognósticos utilizados atualmente são subjetivos e de pouca confiabilidade devido a natureza heterogênea do tumor e a resposta terapêutica variável do mesmo¹⁵. Portanto a busca por biomarcadores é necessária para que se entenda melhor tanto a natureza molecular do tumor

quanto sua diversidade biológica e para que se possa desenvolver ferramentas diagnósticas e prognósticas para uso clínico e terapêutico^{15,16}.

Nos últimos anos, surgiram várias metodologias proteômicas que possibilitaram a observação das proteínas expressas e ampliaram o entendimento dos mecanismos e possíveis vias moleculares no Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço – CCECP. Entre essas metodologias, destacam-se a proteômica baseada na espectrometria de massas (MS), que tem sido muito utilizada para descoberta de proteínas diferencialmente expressas em diferentes tipos de tumores a partir de amostras variadas, como linhagens celulares, tecido, saliva e sangue, a fim de identificar potenciais biomarcadores^{17,18}. Essa técnica tem demonstrado ser uma tecnologia em desenvolvimento para análises qualitativas e quantitativas, localização subcelular e interações proteicas, sendo que recentes avanços nesta área vem gerando um grande impacto sobre o rendimento e a abrangência da proteômica nos estudos sobre o câncer^{18,19}.

No entanto, mais importante que a identificação de uma proteína de maneira isolada é a identificação das alterações em um conjunto de proteínas que podem contribuir para traçar um perfil de expressão protéica específico para uma determinada neoplasia, as chamadas “*protein expression signature*” - PES, ou no português assinatura de expressão protéica^{17,20}. Essa abordagem pode abrir caminho para desvendar redes e vias celulares desreguladas em tumores humanos visando ir além do campo da proteômica voltada somente para a ciência e atingir o campo da proteômica voltada também para a clínica¹⁹.

1.2 Epidemiologia do Câncer de Cabeça e Pescoço

Os dados epidemiológicos do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço no Brasil não são totalmente conhecidos. Segundo as Estimativas de Incidência por Câncer no país, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) e com base nas informações de 23 Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), alimentados por uma rede de 282 Registros Hospitalares de Câncer (RHC) estima-se com dados referentes ao biênio 2014/2015 sobre a ocorrência da doença na população brasileira e nas suas regiões um total de 576.670 casos novos por estado, sendo 302.350 em homens e 274.320 em mulheres. Com relação ao câncer de laringe, estima-se

7.640 novos casos, sendo 6.870 em homens e apenas 770 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 7,03 casos novos a cada 100 mil homens e 0,75 a cada 100 mil mulheres⁶.

O câncer de laringe é o mais comum entre os tipos de câncer de cabeça e pescoço. Cerca de 60% dos casos se iniciam na glote, a área que contém as cordas vocais, enquanto cerca de 35% se desenvolvem na região da supraglote. O restante começa na subglote ou se sobrepõe em mais de uma área^{6,21}.

Na última estimativa mundial foi apontada a ocorrência de cerca de 160 mil casos novos por ano, levando cerca de 83 mil pessoas a óbito. Na região Nordeste o câncer de laringe em homens é o sexto mais frequente, atingindo 4,54 a cada 100 mil homens. Nas regiões Sul (9,21/ 100 mil) e Norte (2,70/100 mil) é o sétimo mais frequente, e, nas regiões Sudeste (9,17/ 100 mil) e Centro-Oeste (5/ 100 mil) o oitavo. Já entre as mulheres é o 16º mais frequente nas regiões Nordeste (1,02/100 mil) e Centro-Oeste (0,99/ 100 mil) e nas regiões Sul (0,85/100 mil), Sudeste (0,55/100mil) e Norte (0,46/100 mil) o 17º mais frequente⁶.

Ainda com relação ao Brasil, a incidência de tumores de cabeça e pescoço é considerada uma das mais altas do mundo, estando entre os 6 tipos mais comum que acometem o sexo masculino e entre os 8 mais comum que acometem o sexo feminino^{4,21}. No entanto a taxa de novos casos de câncer de laringe está caindo em cerca de 2 a 3% ao ano, muito provavelmente porque menos pessoas estão fumando^{4,21}.

Estudos têm sido realizados para determinar os genes e fatores ambientais que estão envolvidos na etiologia e na modulação da presença e gravidade do câncer de cabeça e pescoço^{3,22,23}.

1.3 Aspectos Clínicos

O câncer de cabeça e pescoço usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem lesão de cavidade oral, aumento de volume da região cervical, dificuldade de ingestão de alimentos, rouquidão, sangramento e dor em alguns casos^{24,25}.

A incidência deste tipo de tumor aumenta com a idade, à semelhança do que ocorre com as demais neoplasias^{11,26}. Acomete indivíduos com idade

superior a 40 anos, sendo que a maioria dos casos é identificada em indivíduos com idade superior a 50 anos^{11,26,27,28}.

Acomete mais frequentemente indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, que guardam entre si uma relação de 5:2^{27,29}.

O tipo histopatológico mais comum é o carcinoma de células escamosas (CEC), identificado em cerca de 90-95% dos casos da doença. O CCECP é considerado um problema de saúde pública mundial, uma vez que seus dois principais fatores de risco, o tabaco e o álcool, possuem alta prevalência^{11,29,30}.

Segundo as normas do INCA em um artigo publicado em 2001 na Revista Brasileira de Cancerologia e o livro Rotinas em Oncologia publicado em 2008, os tumores de cabeça e pescoço se subdividem em^{31,32}.

1. Câncer de Cavidade Oral

Essa região é dividida nas seguintes áreas:

- ✓ Lábio,
- ✓ 2/3 anteriores da língua,
- ✓ Mucosa jugal,
- ✓ Assoalho da boca,
- ✓ Gengiva inferior,
- ✓ Gengiva superior,
- ✓ Trígono retromolar,
- ✓ Palato duro.

A grande maioria dos tumores encontrados nessa região é constituída pelo carcinoma de células escamosas que se classifica em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado^{31,32}.

2. Câncer de Orofaringe

Nessa área, os tumores acometem com maior frequência o sexo masculino e está relacionado diretamente com o tabagismo e etilismo. A orofaringe é dividida em quatro regiões:

- ✓ Parede anterior, área glosso-epiglótica, onde se encontra a base da língua (1/3 posterior da língua) e a valécula.
- ✓ Parede lateral, área de localização da loja amigdaliana, das amídalas palatinas, dos pilares e dos sulcos glosso-amigdalianos.

- ✓ Parede superior, onde se encontra a superfície inferior do palato mole e a úvula.

- ✓ Parede posterior, que se continua com suas análogas da naso e hipofaringe, delimitada pelos planos transversais que limitam a orofaringe.

Com relação aos tipos histopatológicos são encontrados nessa região tumores mesenquimais, de glândulas salivares menores, e o mais frequente, carcinoma de células escamosas^{31,32}.

3. Câncer de Nasofaringe

Os tumores originados nesta área podem, por invasão direta e a partir das paredes laterais ou póstero-superior, alcançar a fossa craniana média e acometer estruturas nervosas ao nível do seio cavernoso e dos forâmens que ali existem e, em decorrência disto, provocar uma variedade de sintomas, constituindo quadros clínicos como a síndrome reto-esfenoidal, a síndrome do espaço retroparotídeo, além de presença de linfonodos cervicais aumentados uni ou bilaterais com características metastáticas, sendo essa a principal queixa em 90% dos casos; cefaléia, epistaxe, obstrução nasal, otites repetidas por obstrução da trompa de eustáquio e conseqüente diminuição da audição^{31,32}.

Com relação ao tipo histopatológico, neste caso específico, 85% costumam ser do tipo carcinoma (carcinoma de células escamosas, carcinoma não queratinizado e carcinoma linfoepitelioma), 10% linfomas e os outros 5% adenocarcinoma e sarcomas^{31,32}.

4. Câncer de Hipofaringe

Cerca de 30% dos tumores de faringe se localizam nesta área, o sexo com maior acometimento é o masculino e a localização mais frequente é o seio piriforme, além disso, como os outros tumores de cabeça e pescoço, o hábito de beber e fumar também está relacionado^{31,32}.

A hipofaringe é dividida em três regiões anatômicas:

- ✓ Área pós-cricóide,
- ✓ Seio piriforme,
- ✓ Parede posterior da faringe.

O tipo mais frequente, acometendo cerca de 90% dos casos, é o carcinoma de células escamosas, no entanto também pode ocorrer adenocarcinomas, linfoepiteliomas e tumores mesenquimais variados^{31,32}.

5. Câncer de Laringe

Cerca de 25% dos tumores malignos que acometem a região da cabeça e pescoço e cerca de 2% de todos os tumores, o câncer de laringe é um dos mais comuns. Aproximadamente 2/3 desses tumores surgem na corda vocal verdadeira e 1/3 acomete a laringe supraglótica.

O tabagismo e o alcoolismo tem relação direta com esse tipo de tumor e muitos trabalhos mostram que essa associação, mesmo após o diagnóstico, diminui o índice de cura e aumenta a ocorrência de um segundo tumor primário e por esse motivo muitos pacientes vão a óbito^{31,32}.

A laringe se divide em três regiões:

✓ Supraglote, que inclui epiglote, falsas-cordas, bandas ventriculares, ventrículos, pregas ariepiglóticas e aritenóides. Essa região é rica em vasos e tem uma grande drenagem e por isso, de 25 a 50% dos casos de tumor nessa região tem como consequências metástases em linfonodos³¹.

✓ Glote, que inclui as cordas vocais verdadeiras e as comissuras anterior e posterior. Essa região tem pouca drenagem e conseqüentemente, os tumores de glote tem menor índice de metástase linfodonal³¹. Tumores na região glótica apresentam roquidão como sintoma precoce³¹.

✓ Subglote, que começa 1 cm abaixo das cordas vocais verdadeiras e se estende até a borda inferior da cartilagem cricóide ou primeiro anel traqueal. Tumores nessa região são raros, e podem comprometer os linfonodos pré e paratraqueais, e ocasionalmente mediastinais. Quando aparecem nessa região da laringe, são assintomáticos, e quando apresentam sintomas, já estão em estágios mais avançados^{31,32}.

Na figura 1, temos a representação da laringe humana.

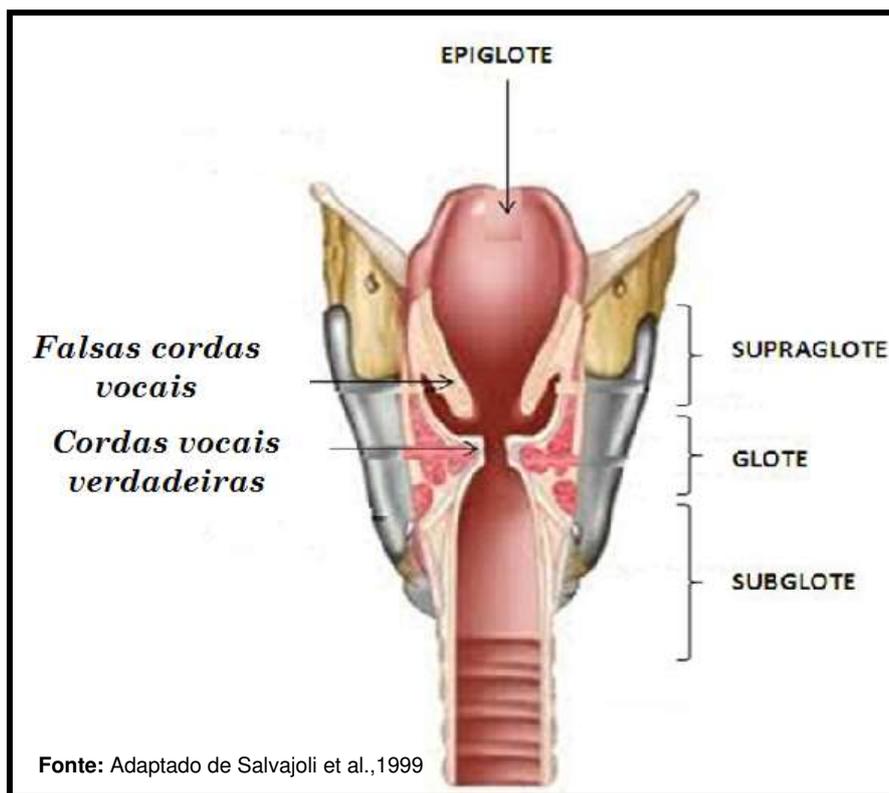


Figura 1: Representação da laringe humana.

Com relação a patologia, a grande maioria dos tumores de laringe são carcinoma de células escamosas e podem se desenvolver a partir da mucosa aparentemente normal, sem estar associada à presença de uma lesão prévia no local do tumor ou podem surgir, através de uma série de estágios histopatológicos de uma hiperplasia benigna a displasia epitelial para carcinoma *in situ* e deste para o carcinoma invasivo^{31,33}(Figura 2).

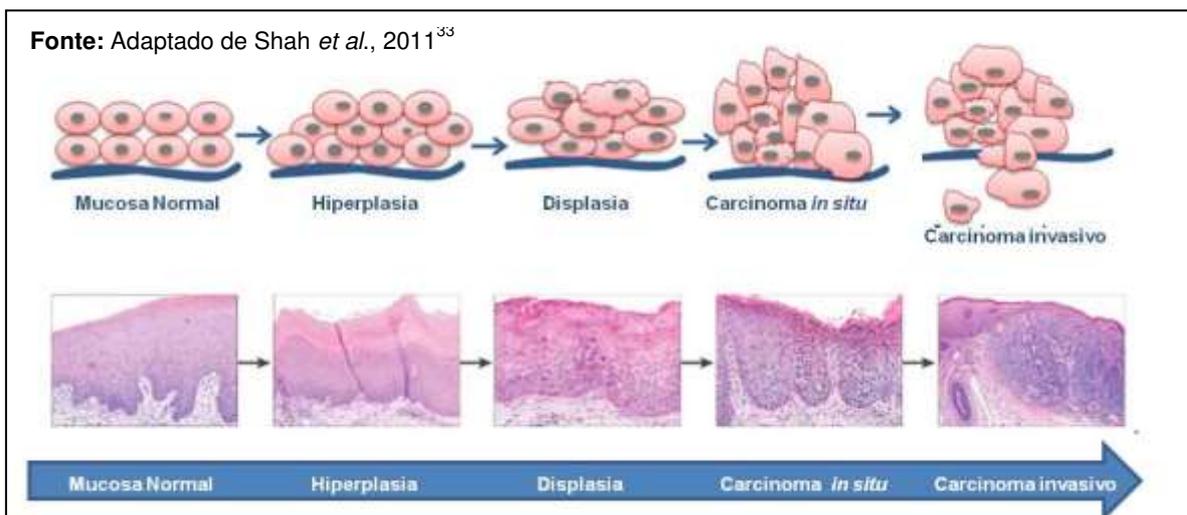


Figura 2: Estágios de progressão do carcinoma de células escamosas.

1.4 Fatores de Risco

O câncer é uma doença genética altamente influenciada por fatores ambientais^{3,34,35}. As causas do aparecimento do tumor são variadas, podem ser internas ou externas, podendo também estar inter-relacionas. As causas internas, na maioria das vezes, são pré-determinadas geneticamente e estão ligadas a capacidade do organismo de se defender e responder as agressões externas. Já as causas externas, estão relacionas aos fatores ambientais, também chamados de cancerígenos ou carcinógenos, já que atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células, e hábitos culturais e sociais. Esses fatores interagem de diversas maneiras e aumentam a probabilidade de malignização celular¹⁰.

1.4.1 Aspectos Ambientais

Os aspectos ambientais são de grande importância para a origem da doença. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) e o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida). Dessa forma, as mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida adotado pelas pessoas, podem determinar diferentes tipos de câncer¹⁰.

Sabe-se que o estilo de vida é capaz de influenciar o aparecimento de alguns tipos de tumor, sabe-se também que o álcool e o tabaco são os dois maiores fatores de risco para os tumores de cabeça e pescoço, principalmente para os tumores da cavidade oral, laringe e faringe^{29,31}. O cigarro possui hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas, que formam adutos com o ácido desoxirribonucléico (DNA) induzindo mutações. Já o álcool é metabolizado à acetaldeído, que forma adutos com proteínas, estes são responsáveis pela produção de anticorpos, inativação de 30 enzimas e prejuízo no sistema de reparo do DNA. O álcool também pode agir como solvente, facilitando a entrada de outros carcinógenos nas células, além de provocar peroxidação lipídica, resultando na produção de radicais livres^{36,37,38,39,40,41,42,43}.

Por isso, é bastante conhecido que indivíduos com hábito de fumar e ou ingerir bebidas alcoólicas têm maior probabilidade de desenvolver carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço^{29,44,45,46,47,48}.

Os tumores de laringe são cerca de 4 vezes mais comum em homens do que em mulheres. Isto pode ser devido os principais fatores de risco, como tabagismo e alcoolismo, serem mais comuns em homens. Entretanto, como o consumo de álcool e tabaco estão se tornando mais frequentes entre as mulheres, os riscos para esses tipos de câncer também têm aumentado no sexo feminino⁴⁹.

Estudos mostram que o tabagismo e o etilismo, parecem agir sinergicamente aumentando o risco de desenvolvimento deste tipo de tumor em relação a população em geral, além de aumentar o risco de acordo com o tempo e quantidade de uso de ambos³. É difícil avaliar o efeito individual destes agentes na etiologia do CCECP, pois os indivíduos fumantes tendem a ser os mesmos a consumir álcool e vice-versa^{50,51}.

Sabe-se também que o padrão da dieta parece contribuir para a ocorrência da doença, sendo o risco associado ao CCECP inversamente proporcional à ingestão de vegetais e frutas frescas. Na dieta carente em ferro, especialmente na forma grave e crônica conhecida como síndrome de Plummer-Vinson há elevação do risco associado ao CEC de faringe e área posterior da boca, pois pessoas com deficiência de ferro na dieta tendem a ter uma redução da imunidade, sendo o ferro essencial para o funcionamento normal das células epiteliais do trato digestivo superior⁵².

Além disso, o alto consumo de carnes cozidas a elevadas temperaturas pode levar a produção dos HPAs (hidrocarboneto policíclico aromático), sendo assim, fatores de risco ao CCECP^{29,53}.

Existe uma gama de trabalhos que analisaram o padrão de dieta como fator influente no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Esses trabalhos sugerem que a dieta a base de cereais, produtos animais e bebidas quentes a base de malte podem estar associado a este tipo de tumor, enquanto dietas a base de frutas, vegetais ricos em carotenóides, vitamina C, antioxidante e flavonóides e azeite de oliva podem proteger desse tipo tumoral^{54,55,56,57,58,59}. Edefonti V et al. em estudo de 2012, sugerem que a dieta

a base de gordura foi associada positivamente ao câncer de laringe, mas se apresentou como fator de proteção para os tumores de boca e faringe⁵⁵.

Ou seja, dietas ricas em gorduras e carentes em legumes, frutas e verduras foram associadas ao CCECP em alguns estudos^{60,61}. Alguns estudos de base hospitalar também reportam que o aumento da ingestão de frutas e vegetais contribui para a diminuição do risco de desenvolver essa neoplasia^{60,61}.

O envelhecimento também traz mudanças nas células, que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células de pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais frequente nesses indivíduos. Os fatores de risco ambientais do câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos e atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células¹⁰.

O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes cancerígenos. Por exemplo, o risco de uma pessoa desenvolver câncer de pulmão é diretamente proporcional ao número de cigarros fumados por dia e ao número de anos que ela vem fumando¹⁰.

Entre outras causas já citadas, as infecções virais também estão associadas ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Cita-se o Epstein-Barr vírus (EBV) e o papiloma vírus humano (HPV). Sabe-se hoje, que 20 a 25% de todos os casos de câncer de cabeça e pescoço estão associados à oncogenes do HPV, particularmente o HPV tipo 16, sendo a região da orofaringe a mais acometida e com maior incidência em jovens com vários parceiros sexuais e praticantes de sexo oral^{62,63,64,65,66}.

Já com relação ao EBV, cujo genoma é identificado em mais de 90% dos casos endêmicos, a grande maioria dos tumores associados são de nasofaringe⁶⁷.

Sugere-se ainda que exposições ocupacionais podem ter relação com o aparecimento deste tipo de tumor, diferentemente da dieta, álcool e tabaco, são involuntárias e afetam trabalhadores. Ainda assim, seu papel na etiologia do câncer de cabeça e pescoço permanece incerto⁶⁸.

Foram apenas encontradas evidências de que o amianto está associado a um risco aumentado para câncer de laringe, os fumos de soldagem, com os

quais metalúrgicos frequentemente trabalham, estão associados a risco aumentado de câncer de faringe e laringe⁶⁹. Exposição ao formaldeído, carvão, pó de cimento e sílica também tem relação com o aumento do índice desse tipo tumoral^{70,71,72,73,74,75}.

Alguns estudos já encontram relação entre câncer de cabeça e pescoço e determinadas ocupações, relatando risco aumentado para profissões como agricultor, pintor, açougueiro, pedreiro, condutor de veículos a motor, pescador, entre outros, além de exposições a certas substâncias químicas como o formaldeído, dioxinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)^{76,77,78,79,80,81,82}.

1.4.2 Aspectos Genéticos

Aproximadamente 5% a 10% dos tumores são devido a predisposição hereditária, sendo as diferenças individuais geradas por polimorfismos gênicos relacionados a mecanismos da carcinogênese, porém a grande maioria dos casos são tumores esporádicos, ou seja, tumores adquiridos³.

Os principais grupos de genes envolvidos na formação do tumor são os proto-oncogenes, que quando ativados se transformam em oncogênes e os genes supressores tumorais, incluindo os genes relacionados ao reparo do DNA. Tem importância na evolução a expressão alterada de genes que promovem a vascularização e disseminação tumoral^{1,8}.

Vários estudos citogenéticos e moleculares investigaram a ocorrência de alterações genéticas em tumores de cabeça e pescoço, demonstrando que ativação de oncogenes, tais como: *ciclina D1*, *H-ras*, *c-myc*, *EGFR*; e inativação de genes supressores tumorais, como: *P16*, *TP53*, *P21* estão envolvidas no desenvolvimento da doença^{39,83,84,85}.

Como mencionado anteriormente o câncer de cabeça e pescoço é determinado tanto por fatores ambientais quanto por fatores genéticos. Os principais fatores de risco reconhecidos são o álcool e o fumo, que são metabolizados de forma variável por genes polimórficos como o do sistema do citocromo *P450*, *CYP1A1* e do sistema da glutatona *S-transferase*, *GSTM1* e *GSTT1*^{86,87}. Seguidos pelo papiloma vírus humano (HPV), predisposição genética, hábito alimentar com grande ingestão de gorduras e pouca ingestão de frutas e vegetais que contêm vitaminas A, C e beta carotenos, que são

sugestivamente consideradas protetores em relação ao desenvolvimento de neoplasias^{61,88}, trauma crônico, ingestão de mate e exposição ocupacional, entre outros^{89,90}.

Sabe-se que mutações em oncogenes, como o *ciclina D1*, em genes supressores tumorais, como o *TP16* e o *P53* e a instabilidade de micro-satélites apresentam ligação com a ocorrência de tumores de cabeça e pescoço^{25,86,91,92,93,94,95}.

Podemos associar alguns polimorfismos de base única (SNPs) em genes diversos como, por exemplo, os genes codificadores de enzimas envolvidas na detoxificação de carcinógenos como as epóxido hidrolases microssomal (*Ephx1*) as glutationas S-transferases (*GSTs*), as N-acetiltransferases (*NATs*) bem como na ativação dos mesmos, como o sistema dos citocromos (*CYPs*), que parecem estar associados à ocorrência dos tumores de cabeça e pescoço^{29,96,97,98,99,100,101,102,103}.

Também o gene *XRCC1*, que é um gene de reparo de DNA, foi associado ao CCECP¹⁰⁴.

Outro gene importante associado ao CCECP é o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) que é responsável pela angiogênese, processo pelo qual os novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir do endotélio preexistente, pois ele se liga especificamente a dois receptores *VEGF* transmembrana tirosina quinases sobre células endoteliais e dá início a um sinal de tradução intracelular que controla a angiogênese e permeabilidade vascular^{105,106}. Sendo assim, o *VEGF* forma os novos vasos sanguíneos que irrigam o tumor, fornecendo nutrientes e oxigênio e promovendo assim o crescimento e invasão das outras células¹⁰⁷. O gene *VEGF* está localizado na região cromossômica 6p21.3 e tem 8 éxons¹⁰⁸.

Outro polimorfismo importante é o receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos associado ao alelo Arg(388) - *FGFR4 Arg(388)*, pois a presença de ao menos um alelo Arg(388) correlaciona-se com a diminuição da sobrevida em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço^{109,110}.

Temos também, a proteína β -catenina que se encontra geralmente na célula normal, sendo um dos componentes do complexo de proteínas na membrana plasmática e é responsável pela junção entre as células. Além

disso, também está presente no citoplasma, mediante ação do sistema de sinalização celular, onde é responsável pela transcrição dos genes no núcleo. Pesquisas mostraram a relação desta proteína na carcinogênese, principalmente quando ela está associada a adesão celular, pois a β -catenina pode se degradar e reduzir sua expressão na membrana, o que indica a invasão e metástase no CCECP^{111,112}.

O polimorfismo Kras-LCS6, localizado no gene *Kras2* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), está associado a uma significativa redução no tempo de vida de pacientes com tumores de cabeça e pescoço e a presença desta variante sugere uma possível alteração do fenótipo ou resposta terapêutica desta doença^{3,43}.

Segundo Chang et al., foram identificadas duas isoformas do gene *Kras*, o *Kras1* e *Kras2*¹¹³. O oncogene *Kras2* foi amplificado em várias linhagens de células tumorais¹¹⁴. McGrath et al., clonaram os genes *Kras1* e *Kras2* e verificaram que o gene *Kras1* é um pseudogene, onde diversas seqüências foram deletadas^{3,115}. No gene *Kras2*, devido ao splicing alternativo, verifica-se a existência de duas variantes, isoformas A e B, que diferem entre si na região C-terminal^{3,84}. O gene *KRAS* codifica uma proteína chamada K-Ras, que está envolvida principalmente na regulação da divisão celular. Através de um processo conhecido como transdução de sinais, a proteína retransmite os sinais provenientes do exterior da célula para o núcleo. Estes sinais instruem a célula a crescer e a se dividir ou amadurecer e assumir funções especializadas (diferenciação)^{3,116}.

Estas proteínas desempenham um papel importante na divisão celular, diferenciação celular, e na auto-destruição das células (apoptose)³.

O outro polimorfismo associado ao câncer de cabeça e pescoço é o polimorfismo SLC23A2-05 no gene transportador sódio dependente de vitamina C, o gene *SLC23A2* (*Solute Carrier Family 23 (Ascorbic Acid Transporter), Member 2*), que codifica proteínas encontradas em frutas cítricas, e modifica o risco de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos portadores do HPV16 Humano^{3,117}. Indivíduos HPV positivos têm um risco aumentado, enquanto nos indivíduos HPV negativos este risco se reduz^{3,118}.

Entretanto, apenas pequenos números de polimorfismos gênicos de uma única via metabólica foram avaliados na maioria dos estudos^{98,99,100,101,102,103}, o

que impediu a avaliação da interação entre eles no metabolismo de carcinógenos ou no reparo de lesões no DNA celular de um indivíduo. Ainda, é possível que outros genes polimórficos envolvidos no metabolismo de carcinógenos ou demais processos da carcinogênese, como metilação do DNA e angiogênese, isolados ou combinados, possam ter papéis tão ou mais importantes na origem ou manifestações clínicas da doença^{98,99,100,101,102,103}.

Existem também casos de câncer de cabeça e pescoço em pacientes que não foram expostos a nenhuma das condições ambientais de risco, reforçando a participação de outros fatores etiológicos neste tipo de tumor, como por exemplo, a predisposição genética^{37,119}, que tem sido observada na associação entre câncer oral e certos grupos étnicos, como os judeus Ashkenazi¹²⁰. Além disso, pacientes com Anemia de Fanconi e Síndrome de Li-Fraumeni também podem ter risco elevado para o câncer de cabeça e pescoço^{121,122}.

Ainda, é fundamental comentar que as frequências dos genótipos de genes polimórficos variam substancialmente em diferentes populações étnicas e, desta forma, suas relações com a origem ou com manifestações clínicas de doenças não podem ser generalizadas para outras populações^{98,100,102,103}.

A identificação dos genes envolvidos no câncer proporciona uma melhor compreensão acerca da doença, além de contribuir para novas formas de diagnóstico precoce, facilitando assim o seu tratamento³⁸.

1.5 Diagnóstico, tratamento e prognóstico

O tumor de laringe pode ocorrer na glote, supraglote, subglote ou hipofaringe e em cada uma das localidades acometidas podem aparecer sinais ou sintomas diferentes, levando a diagnósticos e prognósticos também diferenciados.

O tumor de laringe que se forma nas cordas vocais (glote), muitas vezes causa rouquidão ou alterações na voz, isto pode levar a um diagnóstico em estágio inicial. Porém para tumores que não se iniciam nas cordas vocais, a rouquidão ocorre somente após o tumor atingir as cordas vocais e estar em um estágio mais avançado. Muitas vezes, estes tumores só são diagnosticados depois de se disseminarem para os gânglios linfáticos, o que causa uma massa no pescoço e chama atenção do paciente¹²³.

Além disso, os tumores que começam na supraglote, subglote ou hipofaringe são frequentemente detectados em estágios avançados, por não apresentarem sintomas, como a rouquidão por exemplo. No entanto os esse tipo de tumor pode dar outros sinais como¹²³:

- ✓ Ferida na garganta que não cicatriza,
- ✓ Tosse constante,
- ✓ Dor ao engolir,
- ✓ Dificuldade para engolir,
- ✓ Dor de ouvido,
- ✓ Dificuldade para respirar,
- ✓ Perda de peso,
- ✓ Nódulo ou massa no pescoço.

O principal agravante deste tipo de tumor é o fato de serem tumores oligossintomático no início, seja devido ao padrão de inervação sensitiva ou devido à superfície irregular da mucosa, em especial as tonsilas palatinas, onde um pequeno carcinoma pode ficar oculto ao exame clínico, ou ainda pelo padrão de inspeção do paciente que pode nem sempre estar atento aos sinais dados pelo organismo¹²⁴.

Ao procurar o médico, a única maneira de confirmar a hipótese de um tumor é remover uma amostra da área suspeita e enviá-la para análise, o que se denomina biópsia¹²⁵.

Pode ser realizada a biópsia endoscópica, já que a laringe é um órgão profundo e de difícil acesso. A retirada de material é muitas vezes realizada no centro cirúrgico com o paciente anestesiado e com o auxílio do laringoscópio. Pode-se realizar também a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), este tipo de exame não é utilizado para recolher amostras da laringe e sim para diagnosticar se o gânglio do pescoço aumentado em questão foi atingido ou não pelo tumor¹²⁵.

No caso desses tumores, os exames de imagem como tomografia computadorizada, ressonância magnética, esofagograma, raio X de tórax e PET scan, auxiliam tanto no diagnóstico, pois ajudam a identificar a localização exata do tumor, detectar presença de metástase ou recidivas, quanto na eficácia do tratamento¹²⁶.

A melhor forma de diminuir a incidência dessa doença é controlar os fatores de risco que conhecidamente favorecem seu desenvolvimento. Para reduzir a mortalidade, é necessário que seja realizado diagnóstico precoce por meio do exame clínico dos tecidos lesados, realizado obrigatoriamente por um profissional de saúde capacitado, com o qual será possível identificar tanto lesões potencialmente malignas quanto o câncer em estágios iniciais e avançados, possibilitando um tratamento menos agressivo e o aumento da sobrevida. O autoexame não deve ser preconizado como método preventivo com o risco de mascarar lesões e retardar o diagnóstico do tumor^{2,127}.

O CCECP também é usualmente classificado de acordo com o grau de diferenciação celular em indiferenciado, pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado³⁹. O grau de diferenciação do tumor é um parâmetro para se prever o prognóstico dos pacientes com CCECP¹²⁸. Outro fator para pacientes com CCECP é o estágio do sistema TNM, principal sistema de estadiamento do tumor utilizado para determinar o prognóstico e a terapêutica adequada (Anexo1). O sistema TNM, realizado segundo as normas da União Internacional Contra o Câncer (UICC), e do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, normas estas que foram unificadas no ano de 2002¹²⁹, considera a extensão de acometimento local do tumor (T), a identificação da presença ou ausência de metástases para linfonodos (N) e presença ou ausência de metástases para regiões à distância (M)¹³⁰. Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por este sistema (estádios 0, I, II, III e IV), sendo que as maiores probabilidades de sobrevivência são observadas naqueles com doença localizada e as menores probabilidades de sobrevivência naqueles com a doença avançada^{39,128,131}.

Quando diagnosticado em estágios iniciais, o câncer de laringe possui um bom prognóstico com alto percentual de cura de 80% a 100% e o tratamento cirúrgico radical ou a radioterapia conjunta ou não com a quimioterapia oferecerem sobrevida de cinco anos para cerca de 60-80% dos pacientes^{6,132,133}. Entretanto, a maioria deles chega aos hospitais de referência com a doença avançada, o que torna o prognóstico reservado, ou seja, a taxa de sobrevivência de cinco anos livre da doença, no caso do câncer oral é de 76% em pacientes de CCECP nos estágios I e II e cai para 41% quando existe

comprometimento dos linfonodos cervicais e para 9%, quando há metástase abaixo da clavícula, mesmo quando adequadamente tratados^{86,134}.

A alta incidência da doença e o índice de sobrevida global de cinco anos para 65% dos pacientes com CCECP nos estágios iniciais (I e II) e de menos de 30% para aqueles com tumores de estágios mais avançados (III e IV) justificam a busca de maior conhecimento sobre a sua etiologia e fisiopatologia em diferentes grupos étnicos¹²⁴.

Os tumores de cabeça e pescoço, além de serem considerados uma doença grave, tem o impacto que é causado nos aspectos funcionais e estéticos, pois essa região é responsável por funções básicas como falar, deglutir e respirar^{135,136}.

As principais formas de tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço envolvem a remoção cirúrgica do tumor, a quimioterapia e a radioterapia, porém uma parcela considerável dos pacientes evolui para o óbito devido às complicações da doença em um período menor de cinco anos após o diagnóstico de confirmação do tumor^{12,86}. O diagnóstico imediato e tratamento intensivo são vitais para uma pessoa com câncer¹.

As cirurgias nessas áreas costumam ser mutiladoras, pois muitas vezes é inevitável a perda de alguns órgãos e conseqüentemente da função de outros. Já os efeitos da radioterapia associada ou não à quimioterapia podem gerar efeitos colaterais transitórios^{137,138,139}.

Geralmente, ocorre alteração na voz, dificuldade para engolir, dor no local, dispnéia, tosse, fadiga, alteração no olfato, além de problemas em decorrência da imagem corporal como ansiedade, depressão, perda da autoestima e isolamento social, levando a conseqüências negativas na qualidade de vida do paciente^{135,138,140,141,142}.

O diagnóstico precoce, a prevenção e controle do câncer, devem adquirir o mesmo foco de outras doenças, pois o crescente aumento do número de casos necessita de um cuidado especial para evitar que falem recursos para o tratamento adequado desses pacientes, juntamente com as demais necessidades, caso contrário, as conseqüências serão mortes prematuras. Além disso, a alta incidência da doença e o prognóstico reservado observado na maioria dos casos justificam a busca por maior conhecimento sobre a sua etiologia e fisiopatologia.

1.6 Proteoma

O termo proteômica foi introduzido em 1995 por Mark Wilkins, para descrever todas as proteínas que são expressas em um genoma¹⁴³.

O proteoma é o conjunto de proteínas expressas por um genoma em determinadas condições de tempo, espaço, estado patológico e estímulos externos e por isso, reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condições fisiológicas específicas, fato que o torna um poderoso instrumento de estudo, sabendo-se do dinamismo da expressão gênica de uma célula, e dependente de vários fatores atuantes no momento, como por exemplo, o estado de desenvolvimento, a presença de ativadores e inibidores, condições do meio ambiente, entre outros. Por isso, a proteômica é a melhor ferramenta para se entender o funcionamento dos genes, pois analisa o produto final do genoma¹⁴⁴.

A identificação de todas as proteínas codificadas no genoma de um organismo é difícil, porém, as informações obtidas em estudos proteômicos são cada vez mais completas¹⁴⁵. Essas informações referem-se às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais e informações cruciais sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos.

A proteômica nos leva a três vertentes principais, as quais nos permitem:

- ✓ A descoberta de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, agregando e gerando conhecimento tanto para a biologia celular quanto para a bioquímica;
- ✓ Viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, o que acarreta o desenvolvimento de novos medicamentos;
- ✓ A identificação e caracterização de biomarcadores: moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico.

Um biomarcador ou marcador biológico pode ser uma molécula única ou uma combinação de várias moléculas e deve permitir análises confiáveis demonstrando alta especificidade e sensibilidade analítica¹⁴⁶.

Os biomarcadores tumorais podem ser representados não só por DNA, mRNA, microRNA, proteínas e peptídeos, mas também por carboidratos ou pequenas moléculas como por exemplo os metabólitos¹⁴⁷.

Atualmente a proteômica é considerada um campo emergente já que permite a detecção do perfil de proteínas diferencialmente expressas, interações e modificações proteicas com alta sensibilidade^{148,149}.

Além disso, consideram-se as metodologias utilizadas na proteômica bastante vantajosas em relação às usadas na genômica para detectar biomarcadores para o câncer e alvos para terapia molecular¹⁵⁰.

Isso ocorre pelo simples fato de que os perfis proteicos podem ser mais precisos para uma doença, já que a grande maioria das funções biológicas são realizadas por proteínas¹⁵¹. Já nos genes as alterações expressas nem sempre tem consequências funcionais evidentes, levando a não reflexão da proteína expressa ou da atividade proteica, devido à imensa quantidade de modificações pós-traducionais possíveis¹⁵².

A proteômica dispõe hoje de inúmeras ferramentas, com destaque para a espectrometria de massas (MS). A MS se apresenta como inovadora e de rápido desenvolvimento para análises proteicas quantitativas e qualitativas, investigações de modificações pós-traducionais, localização subcelular e interações proteicas. Segundo Matta A et.al. 2008, os avanços nessa área estão gerando grande impacto sobre a eficiência e a abrangência da proteômica nos estudos sobre o câncer¹⁹. Graças a isso é possível abrir novos caminhos para a descoberta de possíveis biomarcadores e desvendar redes e via celulares desreguladas em células tumorais humanas^{19,153,154}.

Para as análises proteômicas, pode-se dizer que o uso ou não da espectrometria de massas na metodologia, faz bastante diferença.

Nas análises sem o uso da espectrometria de massas é necessário o conhecimento prévio das proteínas a serem estudadas, para tal efeito pode-se usar as técnicas de ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (*ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), a imuno-histoquímica (IHQ), o *western blot* (WB) e, mais recentemente, o microensaio de tecido (do inglês *tissue microarray - TMA*) e o microensaio de proteína (do inglês *protein microarray - PMA*). Essas técnicas podem ser usadas também para validar as proteínas encontradas pela abordagem da espectrometria de massas¹⁵⁵.

Já nas análises com o uso da espectrometria de massas o conhecimento prévio não se faz necessário, o que nos permite a descoberta de

biomarcadores¹⁵⁶. Assim sendo, conclui-se que o uso da espectrometria de massas é mais vantajoso em relação às demais técnicas¹⁵⁶.

A MS consiste em uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector no qual diversas fontes de ionização podem ser empregadas para avaliação de amostras clínicas. Ela visa medir um grande número de proteínas desconhecidas digeridas em peptídeos em uma amostra através da separação física e química dos íons e pela determinação da razão massa/carga (m/z) dos mesmos¹⁵⁷.

As técnicas mais utilizadas são MALDI-TOF (ionização e dessorção a laser assistida por matriz) e a ESI (fonte de ionização por eletrospray)¹⁵⁵. Além disso, a espectrometria de massas em conjunto com outros métodos pode ser usada para separar as proteínas extraídas a partir de amostras complexas. Entre elas, a cromatografia líquida de alto desempenho juntamente com a espectrometria de massas em tandem conhecida como proteômica Shotgun ou pela sigla LC-MS/MS consiste na digestão enzimática das proteínas seguida pela separação dos peptídeos por hidrofobicidade por um sistema de cromatografia líquida seguida pela análise no espectrômetro de massas o que permite a análise rápida e a identificação da sequência dos peptídeos, sendo a principal vantagem a identificação global das proteínas^{158,159,160,161,162}.

Com relação às diferentes estratégias proteômicas baseadas na espectrometria de massas, temos três métodos mais utilizados atualmente: marcação com isótopos estáveis, marcação com isóbaros e quantificação sem marcação (label-free). Todas são muito utilizadas na identificação de biomarcadores do câncer, pois estudam a expressão diferencial de proteínas, modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína em amostras de células tumorais visando a detecção precoce, alvos terapêuticos ou o monitoramento da resposta ao tratamento^{163,164}. Porém esses métodos têm algumas limitações como, por exemplo, necessidade de amostra mais concentrada e alto custo dos reagentes^{154,165}. Por esse motivo, o método label-free tem sido amplamente utilizado por ser mais rápido e ter um preparo mais simples e econômico. O método label-free consiste na quantificação relativa, ou seja, inclui a contagem dos espectros dos peptídeos e medições da área dos picos cromatográficos¹⁶⁶. Essa análise quantitativa pode ser por intensidade de íon precursor (valor quantitativo do pico de íon precursor), *spectral counting*

(contagem dos espectros identificados para cada proteína) e TIC, *total TIC* e *average TIC* (soma ou média das áreas sob os picos de cada peptídeo) ¹⁶⁶.

A grande maioria dos estudos que visam detectar biomarcadores usam a alta capacidade de coleta de dados da espectrometria de massas para comparar tecidos normais e tumorais a fim de identificar proteínas diferencialmente expressas entre as duas amostras ¹⁶⁷.

Para atender essa demanda de comparação de inúmeras proteínas em diferentes amostras, a cada dia diferentes técnicas são desenvolvidas isoladamente ou combinadas para permitir que uma gama maior de biomarcadores sejam descobertos e futuramente aplicados na prática clínica ¹⁵⁴.

Dessa forma, algumas técnicas não proteômicas são utilizadas em conjuntos para o melhor desempenho do resultado final.

Uma delas é a técnica de microdissecção a laser (ML). Essa técnica possibilita o isolamento de uma única célula, ou de uma população celular desejada no meio de vários outros tipos celulares, facilitando a análise posterior por espectrometria de massas e aumentando a chances de encontrar um potencial biomarcador ^{168,169,170}.

1.6.1 Biomarcadores identificados por proteômica para o câncer.

Uma molécula biológica que pode ser encontrada na saliva, no sangue ou nos tecidos e que pode indicar a presença de um tumor pode ser considerada um biomarcador ou marcador biológico ¹⁵⁴. Elas são de extrema importância, pois podem servir como ferramentas no diagnóstico precoce, monitoramento da progressão da doença, além de determinar a resposta ao tratamento e auxiliar no desenvolvimento de novas drogas ^{171,172}.

Tudo começou em 1847 quando Henry Bence-Jones descobriu na urina de um paciente com mieloma múltiplo as famosas “proteínas de Bence-Jones” ¹⁷³. Porém somente em 1988 elas foram aprovadas para uso rotineiro como um teste imunodiagnóstico para o mieloma múltiplo pelo *U.S. Food and Drug Administration – FDA*, que em português significa Administração de Comidas e Remédios e é um órgão do governo dos Estados Unidos responsável por controlar os alimentos e medicamentos através de testes e pesquisas.

O estudo da proteômica baseado na espectrometria de massas vem gerando a identificação de novos possíveis biomarcadores para efeito diagnóstico, prognóstico e preditores de tratamento para os tumores mais comuns, entretanto para que sejam aprovados pela *FDA*, ainda são necessárias muitas validações^{174,175}.

Atualmente, mais de 1.200 proteínas já foram identificadas com níveis diferencialmente expressos entre células tumorais e normais, entretanto pouquíssimas foram consideradas biomarcadores para o câncer¹⁷⁴.

Alguns dos marcadores já aprovados estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1: Lista de biomarcadores aprovados pelo FDA para o câncer.

BIOMARCADOR	NEOPLASIA	REFERÊNCIA
CEA	Efusão pleural maligna	Li et al., 2003 ¹⁷⁶
CEA	Câncer peritoneal disseminado	Yamamoto et al., 2004 ¹⁷⁷
HER-2/NEU	Câncer de mama estágio IV	Cook et al., 2001 ¹⁷⁸
ANTÍGENO TUMORAL DE BEXIGA	Câncer urotelial	Mian et al., 2000 ¹⁷⁹
TIREGLOBULINA	Câncer da tireóide metastático	Lima et al., 2002 ¹⁸⁰
ALFA-FETOPROTEÍNA	Carcinoma hepatocelular	De Masi et al., 2005 ¹⁸¹
PSA	Câncer de próstata	Gann et al., 1995 ¹⁸²
CA 125	Carcinoma pulmonar de células não pequenas	Dabrowska et al., 2004 ¹⁸³
CA 19,9	Câncer pancreático	Yamaguchi et al., 2004 ¹⁸⁴
CA 15,3	Câncer de mama	Ciambellotti et al., 1995 ¹⁸⁵
PROLACTINA, OSTEOPONTINA, LEPTINA, IGF-II	Câncer de ovário	Mor et al., 2005 ¹⁷⁵
CD98, FASCIN, 14-3-3 ETA, sPIgR	Câncer de pulmão	Xiao et al., 2005 ¹⁸⁶

Fonte: Adaptado de Flores IL, 2013¹⁸ e Polanski & Anderson, 2007¹⁷⁴

Com relação aos tumores de cabeça e pescoço, são apresentados estudos de biomarcadores individuais como, por exemplo, o p16, p53, Bcl-2, ciclina D1 (CCND1), Cox-2, receptores de tirosina-quinase tais como, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF); metaloproteínases de matriz (MMPs) e marcadores de instabilidade genômica que têm demonstrado resultados inconsistentes e por vezes contraditórios^{18,186,187,188}.

O gene da ciclina D1 (*CCDN1*), localizado em 11q13, é expresso em células epiteliais na transição da fase G1-S do ciclo celular. Em alguns tipos celulares induz a apoptose¹⁸⁹. A atividade da ciclina D1 pode ser inibida por vários genes supressores tumorais incluindo as proteínas p16 (gene *CDKN2A - Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), p21 (gene *WAF1/CIP1- cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) e p27 (gene *KIP1 - cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*). Vários estudos mostram que a amplificação ou hiperexpressão desse gene foi associada com a doença em estágio avançado, expansão precoce de nódulos, resposta ruim à quimioterapia e redução da sobrevida^{190,191,192}. A amplificação da região 11q13, onde se localiza o gene da ciclina D1, e também se encontram os *oncogenes* *INT-2 (FGF-3)*, *HST-1 (FGF-4)*, *CICLINA D1 (PRAD-1, BCL-1)* e *EMS-1* foram correlacionadas com carcinomas invasivos e está presente em 30 - 50% dos tumores¹⁹².

A proteína p16, codificada pelo gene supressor tumoral *CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)*, localizado na região 9p21, pertence a família dos inibidores de quinase dependentes de ciclina, que incluem as proteínas p15 (gene *INK4B - cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*), p21 e p27. Estes genes regulam a fase G1 do ciclo celular de maneira negativa. A proteína p16 se liga a CDK4 (*cyclin-dependent kinase-4*) e CDK6 (*cyclin-dependent kinase-6*), inibindo sua associação com a ciclina D1. A inibição da atividade do complexo ciclina D1/CDK4/6 interrompe a fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma) e a liberação do fator de transcrição E2F, o que leva à inibição do ciclo celular na fase de transição G1-S. Alterações genéticas em p16 podem conferir vantagens para o crescimento celular contribuindo com o processo de crescimento tumoral¹⁹³. Estudos mostram que a proteína p16 alterada está associada com a baixa sobrevida, aumento de recidivas, progressão tumoral e metástase nodular¹⁹⁰. Entretanto, os resultados relacionados ao prognóstico,

utilizando a proteína p16 como um biomarcador para tumores de cabeça e pescoço são conflitantes^{194,195,196}.

O gene supressor tumoral *TP53* (*tumor protein p53*), localizado na região 17q13, está envolvido em muitas funções celulares, entre elas a manutenção da estabilidade genômica, progressão do ciclo celular, diferenciação celular, reparo a danos no DNA e apoptose. A produção da proteína p73, que tem sido encontrada em mais de 50% dos CCECP e hiperexpressa em 65% destas lesões, é aumentada na célula em resposta aos danos causados no DNA, induzindo a parada do ciclo celular na transição G1/S. Se o dano não for reparado, o p53 leva a célula a apoptose¹⁹⁷. Na presença de mutações deste gene, o produto gênico é frequentemente encontrado em altas concentrações. No câncer de cabeça e pescoço, são relatadas mutações em 33 a 59% dos casos, perdas alélicas em 38% e expressão aumentada da proteína em 37 a 76%^{190,198}. A detecção de mutações nas margens cirúrgicas ou nos nódulos linfáticos cervicais considerados histologicamente livres da doença pode auxiliar na localização das células cancerígenas persistentes, no sangue ou na medula óssea, na ausência de doença clínica, radiológica e histopatológica. Isto poderia, teoricamente, evidenciar a necessidade de uma terapia adjuvante¹⁹⁹. Já a hiperexpressão dessa proteína nos tumores primários é considerada um sinal preditivo de sobrevida reduzida em função de sua associação com a recorrência de tumores primários e secundários¹⁹¹.

Os inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) se apresentam com expressão elevada em tumores de laringe, e está relacionado a um prognóstico ruim. A ativação deste gene estimula o crescimento e proliferação celular, a angiogênese, a invasão, metástase e a inibição da apoptose. É amplamente expresso por vários tipos celulares, incluindo linhagens epiteliais e mesenquimais^{200,201,202}. O cetuximabe ou ERBTUX® é um anticorpo que bloqueia esse receptor. Outros bloqueadores do *EGFR* estão em estudo para o tratamento dos tumores de cabeça e pescoço, incluindo panitumumab, lapatinib e erlotinib. Estes medicamentos parecem funcionar melhor quando combinados com outros tratamentos, como radioterapia e quimioterapia²⁰³.

A proteína VEGF (gene do fator de crescimento endotelial vascular) foi relacionada à agressividade, invasão e metástase de tumores sólidos. Desempenha um papel crítico na angiogênese, essencial para o crescimento tumoral e ocorrência de metástase. Induz a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais durante o crescimento tumoral pela ligação às quinases receptoras de tirosinas específicas. Vários estudos mostram o valor prognóstico de VEGF e seu papel na promoção da invasão e no comportamento agressivo de tumores de cabeça e pescoço^{107,204,205,206,207}.

As metaloproteínas (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam a maioria dos componentes da matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e fibronectina. A degradação da matriz de colágeno é importante para a invasão de tecidos subjacentes e metástases²⁰⁸. Várias MMPs possuem expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço incluindo MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13^{209,210,211,212}. MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel importante na carcinogênese de cabeça e pescoço por degradar o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal. Alguns estudos mostram uma correlação significativa entre a expressão de MMP-9 e baixa sobrevivência em pacientes com câncer de cabeça e pescoço¹⁹⁴.

O gene *FAS* (*TNF receptor superfamily member*), fatores de necrose tumoral também conhecido como *TNFSF6*, *CD95*, ou *APO-1* é um receptor de superfície celular que desempenha papel central na sinalização da apoptose em vários tipos celulares. Esse receptor interage com seu ligante natural *FASL*, também conhecido como *CD95L*, um membro da superfamília de fatores de necrose tumoral. A diminuição da expressão de *FAS* e/ou o aumento da expressão de *FASL* favorece a transformação maligna e a progressão do tumor. Mutações em linhagens somáticas e germinativas do gene *FAS* e também do gene *FASL* estão associadas com risco aumentado de câncer^{213,214,215}.

A expressão elevada de *C-ERBB-2(HER-2)*, gene codificador do receptor para o fator de crescimento epidérmico, localizado no cromossomo 17, observada em 75% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, também foi correlacionada à baixa sobrevivência^{216,217}.

Expressão diferencial de outros genes, como aqueles relacionados com a matriz extracelular, adesão, motilidade, inflamação e inibição da protease,

tem contribuído para o desenvolvimento de carcinomas oral e faríngeo metastáticos e não-metastáticos¹³¹. A análise dos padrões de metilação (hipometilação e hipermetilação) de genes específicos também pode ser utilizada para diagnóstico precoce^{218,219}.

Genes que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Dois genes em particular, *GSTT1* e *GSTM1*, que codificam enzimas pertencentes à família das glutadiona S-transferases (*GSTs*), parecem relevantes para a suscetibilidade ao CCECP, pois atuam na detoxificação de metabólitos reativos de substâncias carcinógenas da fumaça do tabaco⁹⁹. Os estudos dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* realizados em carcinomas de cabeça e pescoço são contraditórios. Vários autores demonstram uma associação com o genótipo nulo [-] *GSTM1* enquanto outros não. Para o genótipo nulo [-] *GSTT1* também foi demonstrada uma relação em alguns casos e ausência da mesma em outros^{220,221,222,223,224,225,226,227,228}.

Desse modo, a variabilidade individual em genes relacionados aos processos de ativação e desativação metabólica parece crucial na suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço.

Levando em consideração todos os estudos feitos até o momento, inúmeras proteínas diferencialmente expressas no câncer de cabeça e pescoço, já foram identificadas por espectrometria de massas, porém é válido ressaltar que nenhuma dessas moléculas ainda é usada rotineiramente na prática clínica^{17,18,19,229}.

Com relação ao CEC oral, a atividade do ciclo celular e a proliferação de células tumorais malignas envolvem a perda dos mecanismos de controle que garantem o funcionamento celular normal e muitos estudos tem sido desenvolvidos a fim de investigar a expressão de algumas proteínas envolvidas nestes mecanismos demonstrando a identificação de potenciais marcadores biológicos para o diagnóstico e prognóstico do CEC oral^{230,231,232}. Entre os mecanismos envolvidos na patogênese e progressão do CEC aqueles que regulam a transição do ciclo celular da fase G1 para S têm sido estudados com maiores detalhes^{18,232,233}.

Cita-se também, proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs), que são bem relevantes na carcinogênese do CEC de cabeça e pescoço como um

todo^{231,234}, pois estímulos mitogênicos e fatores de crescimento determinam a ativação da ciclina D1 que, por sua vez, ativa a CDK4 e a CDK6 resultando na fosforilação da proteína Rb que libera um fator de transcrição garantindo assim a proliferação celular^{18,235}. Nesse contexto a hiperexpressão de CCND1 já foi associada com prognóstico ruim no CEC oral^{89,236,237}.

Conclui-se assim que o acúmulo e a cooperação entre as várias proteínas existentes são necessárias antes que a célula afetada expresse um fenótipo maligno²³⁸. Dessa forma é importante ressaltar que a identificação de alterações em um conjunto de proteínas podem contribuir para traçar um perfil de expressão protéica específico para uma neoplasia, o famoso “*protein expression signature*” que servirá como um indicador do processo de carcinogênese, de forma a extrapolar do campo da proteômica voltada somente para a ciência para o campo da proteômica voltada para a clínica^{17,18,20}.

Os avanços na compreensão da biologia molecular do câncer de cabeça e pescoço têm aberto novas direções na ciência. O aumento das pesquisas está sendo direcionado para o desenvolvimento de terapias com alvos moleculares ou marcadores moleculares que são úteis na predição dos tratamentos ou na seleção de pacientes para terapias moleculares específicas baseadas nas características dos tumores^{202,239}.

1.6.2 Possíveis Biomarcadores identificados por proteômica para o câncer de laringe.

A respeito dos tumores de laringe, embora alguns estudos sobre o proteoma deste tipo de tumor relatem biomarcadores encontrados, ainda não é possível usá-los clinicamente para a detecção precoce da doença, nem como alvo terapêutico^{240,241}.

Zhao BL et al., 2003 realizaram a análise proteômica através da construção de um banco de dados de proteínas para músculo da laringe humana. As amostras foram obtidas de indivíduos que foram a óbito. Foram identificadas 75 proteínas, as quais foram classificadas em seis grupos funcionais. Os grupos incluíram proteínas de membrana (8,5%), do citoesqueleto e proteínas miofibrilares (14,6%), proteínas de produção de energia (28%), proteínas associadas a respostas ao estresse (8,5%) e

proteínas associadas à regulação da transcrição (10,9%). Cerca de 1/3 ou 29% foram classificados como "outras proteínas". Estes dados forneceram um mapa de referência inicial para estudos comparativos de expressão de proteínas em músculo de laringe humana. Sugere-se neste trabalho que um desenvolvimento mais refinado desta base de dados trará um recurso valioso na análise das condições normais e patológicas que afetam o músculo da laringe²⁴².

Em 2006, Zhang X et al. estudaram o gene supressor tumoral *LCRG1* relacionado ao carcinoma de laringe, com o objetivo de descobrir e caracterizar as proteínas relacionadas a ele, além de desvendar o seu mecanismo molecular. Para isso usaram algumas linhas celulares como, por exemplo, células Hep-2/*LCRG1* e Hep-2/*pcDNA3.1* como modelos. A eletroforese bidimensional foi usada para separar as proteínas, em seguida foi utilizado o MALDI-TOF/MS e o MS/MS. Os resultados foram validados por RT-PCR e *Western Blot*. Foram identificadas 26 proteínas diferencialmente expressas, a maioria foi caracterizada como membros enzimáticos. Essas proteínas visam a contribuição para a função do gene supressor tumoral *LCRG1*²⁴³.

Outro trabalho também com proteínas foi o de Zhou JR et al., 2007, que identificaram proteínas diferencialmente expressas no carcinoma de células escamosas de laringe em comparação com o tecido normal, para isso foi usada a eletroforese bidimensional (2-DE). As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas e identificadas por espectrometria de massa, em seguida foi realizada uma pesquisa no banco de dados. Treze proteínas foram preliminarmente identificadas, sendo 10 delas hiperexpressas no tecido tumoral (cofilina-1, SP140 proteína de corponuclear, GRP94, HSP-90, GSTP1-1, superóxido dismutase [Mn], ciclofilina A, subunidade de proteassoma ativador complexo 2, apolipoproteína precursor AI, proteína de CaM-like). Três delas hipoexpressas no tecido tumoral: proteína de ligação de ácidos graxos, calgranulina A e calgranulina B. Os pesquisadores concluíram com esse trabalho que as 13 proteínas com diferença de expressão estavam associadas ao carcinogênese do tumor de cabeça e pescoço, o que pode apontar uma possível estratégia para combater essa doença²⁴⁴.

A fim de identificar potenciais biomarcadores, Sewell DA et al., 2007 realizaram uma análise proteômica em amostras de câncer de laringe. Usando

eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, perfis de expressão de proteínas de carcinoma de laringe e de tecido normal foram analisados. Os resultados da análise mostram que a expressão de um número de proteínas foi alterado de forma significativa nas amostras tumorais, quando comparadas com os controles normais correspondentes. Foram identificadas as proteínas diferencialmente expressas, que incluíram *stratifin*, S100A9 proteína ligante de cálcio, p21-ARC, *stathmine* e *nolase*. Com os resultados, identificaram potenciais biomarcadores que podem contribuir para a patogênese deste tipo de tumor, e que podem ser adequados como novos alvos terapêuticos e/ou diagnósticos²⁴⁵.

Em 2010 Holgersson G et al., procuraram explorar a utilidade da expressão de cinco biomarcadores de câncer em pacientes com câncer de laringe. Para isso foi utilizado os registros do banco de dados do Registro Nacional de Câncer sueco, onde foram identificados pacientes com câncer de laringe diagnosticados durante os anos de 1978-2004 na região de Uppsala-Orebro e tratados com radioterapia. A expressão de Ki-67, MutS homólogo2, (MSH2), p53, CLL de células B/linfoma2 (Bcl-2) e de ciclina D1 nas células tumorais foram avaliadas por imuno-histoquímica utilizando microensaio de tecido (TMAs) e a taxa de sobrevida e recidiva foram analisadas por regressão Cox. Trinta e nove pacientes foram estudados, no entanto, a análise COX não mostrou associação estatisticamente significativa entre a expressão dos biomarcadores investigados e a taxa de sobrevida e recidiva nesses pacientes. No entanto, os pesquisadores acreditam que em um número maior de amostras a caracterização de proteínas utilizando TMA e imuno-histoquímica seria uma estratégia viável para o prognóstico e um preditivo de triagem de biomarcadores em tumores de laringe²⁴⁶.

Zhang H et al., 2011 avaliaram as proteínas encontradas no soro de seis pacientes com carcinoma de laringe. A análise foi feita com amostras pré e pós-cirúrgica através da eletroforese bidimensional combinada com a espectrometria de massas e seguida por análise em banco de dados de proteínas que indicaram 12 proteínas com expressão alterada, sendo 6 no grupo pré operatório. As proteínas encontradas foram validadas por *Western Blot* que indicaram possíveis papéis do estresse oxidativo e resposta imune como alvo no acompanhamento e tratamento de carcinoma de laringe. Este

estudo forneceu uma nova visão sobre o desenvolvimento e tratamento do carcinoma de laringe, e as proteínas identificadas devem ser estudadas com mais atenção para que se obtenham maiores informações²⁴⁷.

O estudo de Kim JS et al. de 2012, propôs uma comparação entre as proteínas resistentes a radioterapia, visto que o maior obstáculo para a cura dos tumores são atribuídos a resistência tumoral. Para determinar esse mecanismo resistente a radiação é de extrema importância comparar as proteínas diferencialmente expressas em células sensíveis e células resistentes a radioterapia. Recentemente a proteína aldeído redutase (AKR1A1) foi identificada como aumento da resistência a radioterapia em pacientes com câncer de laringe. Neste estudo foi usado o mecanismo de radiorresistência de AKR1A1 por meio da via de regulação p53. Após a realização do estudo o grupo concluiu que a radiação induzida por AKR1A1 contribui para a radiorresistência adquirida nas células tumorais de laringe através da supressão da ativação do p53 por meio de uma interação inibitória²⁴⁸.

Lin Chung et al. em 2013, com o objetivo de encontrar biomarcadores, compararam e analisaram as proteínas diferencialmente expressas no plasma de 6 pacientes com carcinoma de laringe e 6 indivíduos saudáveis. As proteínas foram isoladas pela eletroforese bidimensional e os spots identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF /TOF, em seguida foi feita a análise bioestatística e observou-se 20 proteínas diferencialmente expressas, sendo 8 com hiperexpressão, entre elas a L1, C-reactive protein, haptoglobin, ceruloplasmin e 12 com hipoexpressão, entre elas *serotransferrin*, *alpha-2-HS-glycoprotein*, *fibrinogen gamma chain*, *haptoglobin related protein*, *Ig lambda-1 chain C regions*, *Ig kappa chain C region*, *apolipoprotein A-I*, *transthyretin*, *apolipoprotein C-III*. Os autores concluíram com esse trabalho que o perfil proteômico encontrado no plasma dos dois grupos analisados foi diferencialmente expresso, o que permite concluir que as proteínas encontradas podem ser potenciais biomarcadores para pacientes com câncer de laringe²⁴⁹.

Em um estudo de 2014, Li Li et al., usaram a eletroforese bidimensional juntamente com a cromatografia líquida e a espectrometria de massas para identificar e analisar as proteínas diferencialmente expressas no tecido normal e tumoral de pacientes com carcinoma de células escamosas de laringe com a

finalidade de identificar possíveis biomarcadores. Para isso foram analisados o material de 34 pacientes, sendo 32 homens e 2 mulheres. Como resultado, foram identificadas 281 proteínas com diferença significativa na expressão e quatro delas foram diferenciais: *Profilin-1 (PFN1)*, *Nucleolin (NCL)*, *Cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP2)* e *Mimecan (OGN)*. Em seguida, foram feitas análises de bioinformática, incluindo ontologias (GO) e análise de rede de diferentes proteínas. Em processo subsequente foi realizada a validação das quatro proteínas diferencialmente expressas através de RT-PCR e *Western Blot*. Esse trabalho mostrou pela primeira vez, que a proteína PFN1 está envolvida na metástase do carcinoma de células escamosas de laringe e que as quatro proteínas encontradas com diferença de expressão (PFN1, NCL, CNDP2 e OGN) podem ser novos alvos diagnósticos e terapêuticos para carcinoma de células escamosas de laringe²⁵⁰.

Conforme mencionado acima, especificamente para o câncer de laringe ainda não tem muitos trabalhos sobre proteômica descritos na literatura, sendo que nenhum deles utilizou a microdisseção a laser, e os biomarcadores encontrados necessitam de mais estudos para que possam ter uma aplicação prática efetiva.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

O conhecimento das proteínas que são diferencialmente expressas nas células normais, displásicas e tumorais pode trazer subsídios para melhor entendimento dos processos metabólicos envolvidos tanto na etiologia como no desenvolvimento do Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço.

A respeito dos tumores de laringe, embora alguns estudos sobre o proteoma relatem biomarcadores encontrados, ainda não é possível usá-los clinicamente para a detecção precoce da doença, nem como alvo terapêutico. Assim sendo, o conhecimento de tais proteínas poderá abrir uma gama de linhas para estudos funcionais e terapêuticos, bem como a utilização de novos marcadores de gravidade e susceptibilidade relacionados a doença.

O objetivo do presente estudo foi triar através do estudo do contexto proteômico das células normais, displásicas e tumorais de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Laringe, possíveis biomarcadores.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – FCM/UNICAMP sob o parecer 873/2007 (Anexo 2).

Todos os pacientes submetidos a este estudo concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3).

3.2 Casuística

Trata-se de um estudo prospectivo, sendo a coleta de material realizada de Abril de 2012 a Abril de 2014.

O material coletado inicialmente para esse estudo era proveniente de biópsias realizadas no Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, mas a qualidade e a quantidade do material eram insuficientes para as análises. Dessa forma, optamos por realizar a coleta de material proveniente de procedimento cirúrgico e as coletas passaram a ser realizadas diretamente no centro cirúrgico do Hospital de Clínicas da Unicamp, juntamente com a equipe de profissionais responsáveis pelo Ambulatório de Otorrinolaringologia.

Após o consentimento dos participantes, foi coletado durante a cirurgia no centro cirúrgico, uma amostra de tecido normal e uma amostra de tecido tumoral em eppendorf de 1,5ml com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 1X (PBS 1X) para a lavagem desse fragmento e precipitação das hemácias dos tecidos coletados. Em seguida as amostras foram transferidas para novos eppendorfs identificados e colocadas em nitrogênio líquido para que não degradassem. Ao chegar ao Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, essas amostras foram armazenadas no freezer a -80°C.

Foram coletados para esse trabalho, amostras de 78 pacientes. Para evitar perda de material, foi colhido material de todas as cirurgias realizadas

com possíveis diagnósticos de carcinoma de células escamosas (CEC) e separado por área: cavidade oral, orofaringe e laringe. A região em que foi colhido um maior número de amostras adequadas para a análise sugerida, foi a laringe, com amostras de 37 pacientes, por isso as análises proteômicas foram realizadas nesse tipo de tumor.

Feito a escolha da laringe como alvo do estudo, foram feitos cortes histológicos em lâminas e usada a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para a confirmação da presença de tecido normal, displásico e/ou tecido tumoral.

No entanto após as análises dos cortes histológicos, conseguimos apenas amostras de 13 pacientes adequadas para uso.

Nos demais pacientes não conseguimos os tecidos adequados para uso, impedindo que as amostras fossem utilizadas neste projeto.

A digestão das amostras assim como a espectrometria de massas no ORBITRAP foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, em Dezembro de 2013 e em Julho de 2014. A proposta de pesquisa está registrada no Síncontron como MAS-15060.

De posse das proteínas encontradas, para que pudéssemos analisar com maior credibilidade, as amostras foram divididas em grupos e foi aplicado o teste estatístico Test T em cada uma das subdivisões e gerados cluster hierárquicos com p-value <0,01 para os grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

3.3 Métodos

A figura 3 representa o fluxograma do estudo proposto.

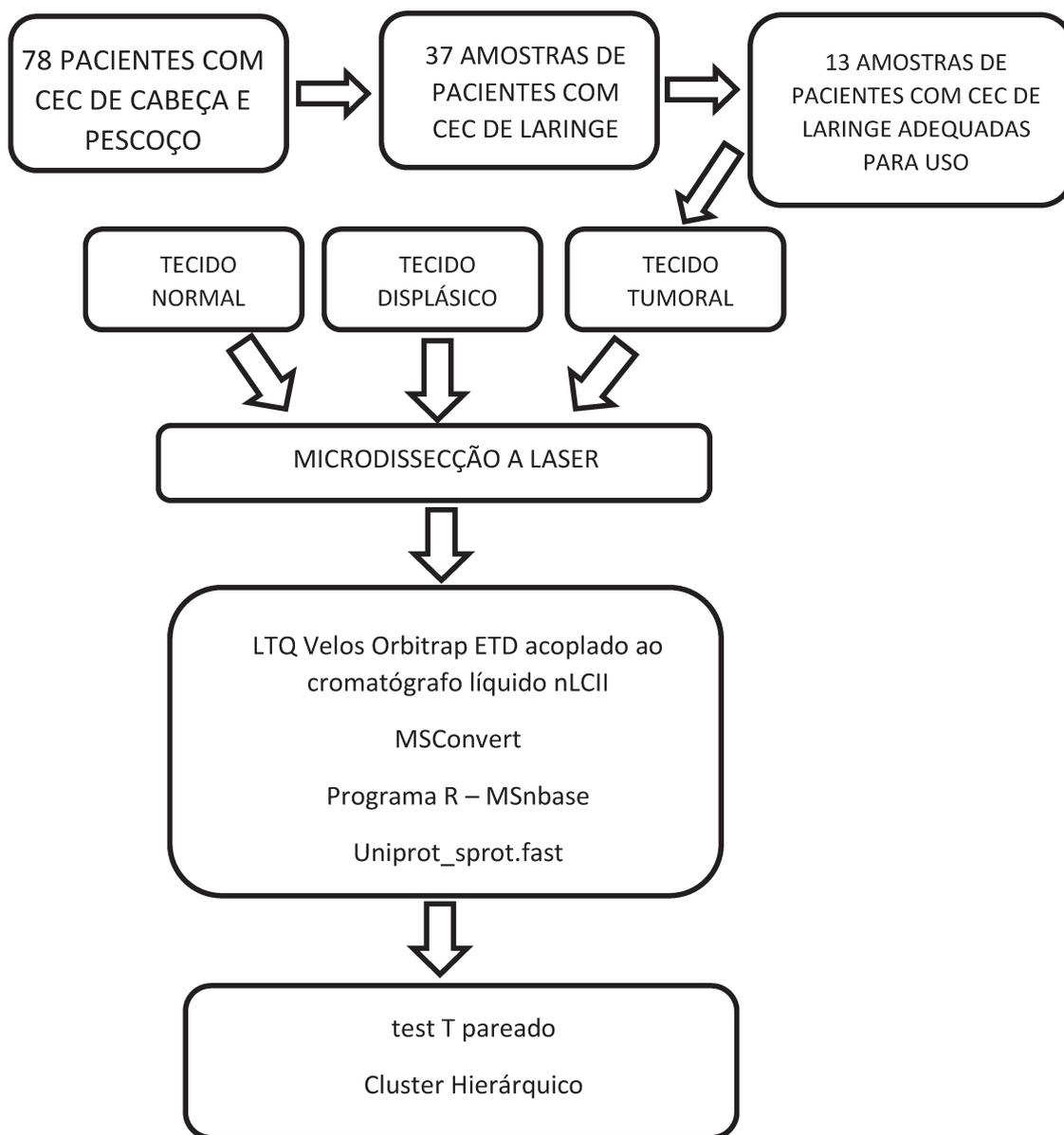


Figura 3: Fluxograma do estudo proposto

3.3.1 Preparo das amostras

3.3.1.1 Análise Histológica

Após a coleta, o passo seguinte foi aguardar a liberação do resultado da biópsia pelo Laboratório de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP. Ao receber a confirmação de Carcinoma de Células Escamosas foi realizado no material coletado por nós, lâminas com cortes histológicos que em seguida eram coradas por Hematoxilina-Eosina para confirmar as condições do nosso material.

As lâminas com cortes histológicos coradas por Hematoxilina-Eosina foi montada da seguinte maneira:

Para cada paciente foram feitas duas lâminas, uma com tecido coletado como normal e outra com o tecido coletado como tumoral, ambos com corte de 4 micras.

A coloração seguiu o seguinte padrão:

- ✓ Hematoxilina por 1 minuto
- ✓ Amônia 1%
- ✓ Eosina 40 segundos
- ✓ Álcool I,II e III
- ✓ Xilol I e II
- ✓ Montagem da lâmina

Dando continuidade, as lâminas foram analisadas pela Prof. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani para confirmar as condições do material.

O tecido tumoral de boa qualidade, sem degradação e com presença de CEC e o tecido normal de boa qualidade, sem degradação e com confirmação de tecido epitelial normal, além de achados displásicos, com condições aptas para uso, foram separados para a realização do passo seguinte: montagem da lâmina para microdissecção a laser.

3.3.1.2 Preparo e montagem das lâminas para microdissecção a laser

A lâmina para microdissecção a laser é uma lâmina da Zeiss (lâmina-membrana 1.0 PEN ref: 415190-9031-000) com uma membrana própria para uso em microdissecador. Essas lâminas foram cortadas e coradas no Laboratório de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP.

Os tecidos normais, displásicos e tumorais, previamente selecionados e congelados a -80°C foram incluídos através da utilização do Tissue Tek O.C.T. Compound da Sakura (Optimal Cutting Temperature) até a cobertura completa da amostra para posterior corte. Todo preparo foi realizado em ambiente climatizado com temperatura de 18°C. As amostras foram mantidas a -20°C durante todo o processo de inclusão. Dando continuidade ao processo, as lâminas da Zeiss foram deixadas em luz ultravioleta por 15 minutos antes de serem utilizadas para que ocorresse melhor fixação dos cortes. Foram feitos

cortes de 4µm de espessura, para evitar sobreposição de material, em criostato Leica Microsystem a -20°C disponibilizado gentilmente pela professora Dra Albina Messias de Almeida Milani Altemani, Professora Titular do Departamento de Anatomia Patológica e responsável pelo laboratório de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP.

As lâminas foram feitas de acordo com o tamanho e a quantidade de material disponível. Para alguns materiais foram necessárias cerca de 10 lâminas, porém para outros cerca de 5 foram suficientes.

Feitos os cortes no criostato, as lâminas foram coradas conforme descrição abaixo:

- ✓ Etanol 100% por 3 minutos
- ✓ Etanol 95% por 20 segundos
- ✓ Etanol 75% por 20 segundos
- ✓ Etanol 50% por 20 segundos
- ✓ Hematoxilina Meyer por 40 segundos
- ✓ H₂O free nucleasse por 5 minutos
- ✓ Eosina por 2 segundos
- ✓ H₂O free nucleasse por 5 minutos
- ✓ Etanol 50% por 20 segundos
- ✓ Etanol 75% por 20 segundos
- ✓ Etanol 95% por 20 segundos
- ✓ Etanol 100% por 3 minutos

Após a secagem, todas as lâminas foram armazenadas no freezer a -80°C até o momento de uso para microdissecção a laser.

3.3.2 Microdissecção a Laser

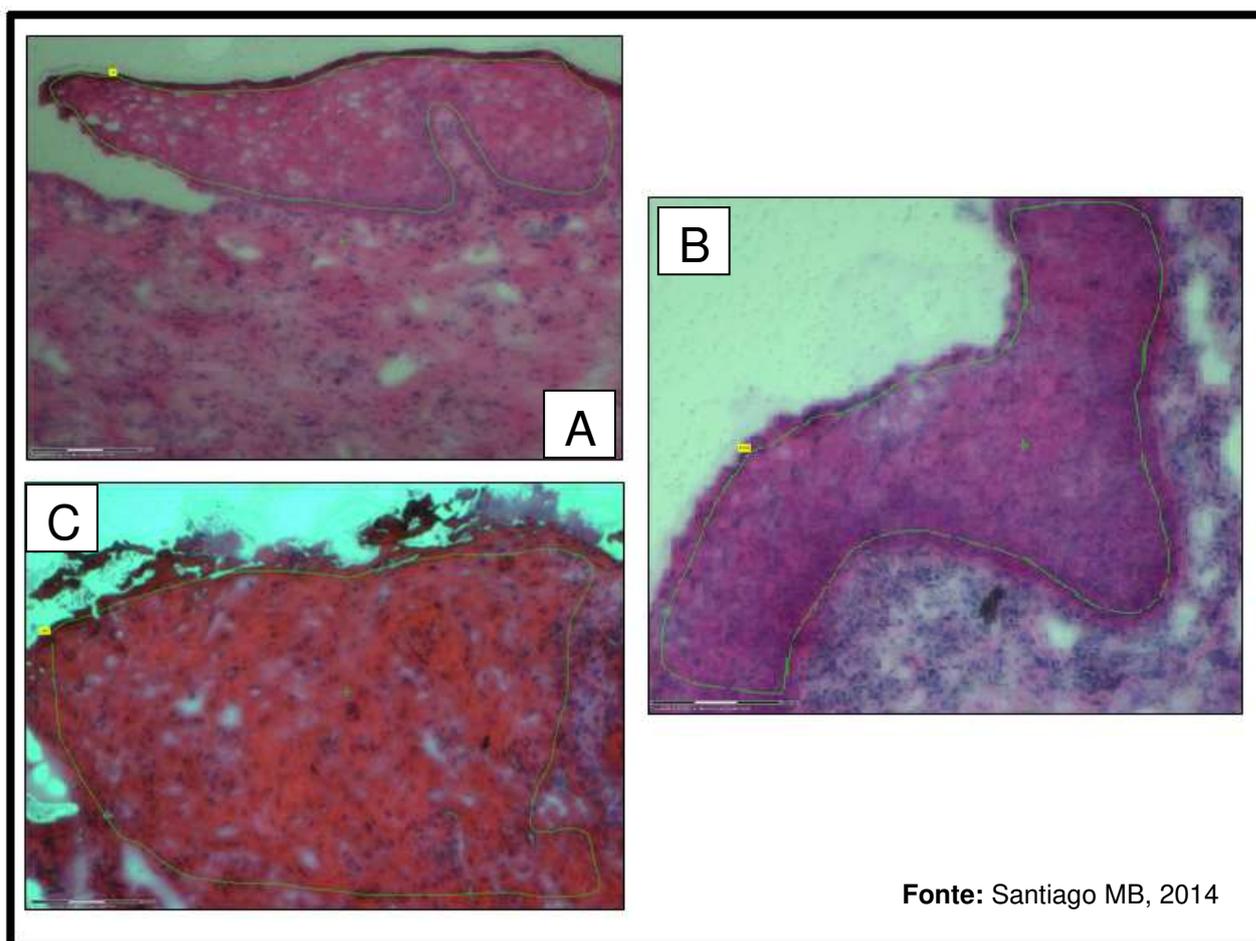
Lembrando que a proposta do nosso trabalho é fazer uma comparação entre o tecido normal, displásico e tumoral do paciente, sendo ele o próprio controle, são necessários cuidados ao separar as amostras, tendo certeza de que as amostras colhidas contenham com os tecidos desejados adequados para uso.

As lâminas especiais foram levadas no Microdissecador a Laser da Zeiss, disponível no nosso laboratório, onde as células foram isoladas, cortadas pelo feixe de laser UV e catapultadas pelo feixe de laser infravermelho

(IR) no qual a população celular de interesse foi aderida na película dos CAPs (AdhesiveCap 500 opaquê, ref: 415190-9201-000), que são tubos de PCR específicos para coleta das células isoladas.

Usamos como padrão para o processo a quantidade ideal de material de um CAP de 1,5ml com a película coberta de células. Os CAPs cheios foram identificados e guardados no freezer a -80°C para posterior análise no espectrômetro de massas.

Na imagem abaixo pode-se observar as lâminas de microdissecção a laser com tecido normal, tecido displásico e tecido tumoral selecionados para a microdissecção a laser (figura 4).



Fonte: Santiago MB, 2014

Figura 4: Lâminas de microdissecção a laser. A – Tecido Normal, B – Tecido Displásico, C – Tecido Tumoral.

3.3.3 Preparação das amostras para análise no espectrômetro de massas

A extração e digestão de proteínas foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, em Dezembro de 2013 e em Julho de 2014. A proposta de pesquisa está registrada no Síncontron como MAS-15060.

O protocolo seguido foi o de rotina utilizado no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências para análises realizadas em ESI Q-TOF para misturas complexas. O procedimento foi realizado em dois dias. No primeiro dia foi realizada a pesagem dos reagentes e o procedimento 1, onde os CAPs foram tratados com uréia a 8M e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi feita a redução com ditioneitol – DTT a 5mM e incubado a 56°C por 25 minutos. A alquilação com iodoacetamida – IAA a 14mM e incubação protegido de luz por 30 minutos a temperatura ambiente, foi o passo seguinte. Em seguida, foi adicionado ditioneitol – DTT a 5mM e novamente incubado protegido da luz por 15 minutos. A amostra foi diluída em 1:5 em 50mM de bicarbonato de amônio para que a concentração de uréia fosse reduzida a 1.6M. O passo seguinte foi a adição de cloreto de cálcio - CaCl_2 1mM. Para finalizar foi preparada a tripsina em concentração final de 20ng/ μl e então adicionada ao CAP que foi incubado por 16hrs a 37°C.

No segundo dia, a reação da enzima tripsina foi parada com ácido trifluoacético na concentração final de 0,4% e as amostras centrifugadas a 2500rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o pellet formado foi descartado. As amostras secaram e após foi adicionado 100 μl de metanol 100% e centrifugada novamente a 3500rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μl de ácido fórmico 0,1%, a amostra foi novamente centrifugada a 3500rpm por 2 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Esse passo foi repetido por 2 vezes.

As amostras foram ressuspensas em ácido fórmico 0,1% e centrifugadas a 3500rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e este passo foi repetido por 2 vezes.

Em seguida as amostras com 100µl de ácido fórmico 0,1% foram centrifugadas a 3500rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. Novamente o sobrenadante foi descartado e esse passo repetido por 10 vezes. Finalmente após a décima vez, as amostras foram secas e mantidas no freezer a -20°C até o dia de colocá-las no ORBITRAP.

3.3.4 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

As amostras foram ressuspendidas e as análises proteômicas foram realizadas no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap ETD acoplado ao cromatografo líquido nLCII ambos da Thermo Fisher™.

O ORBITRAP é um espectrômetro de massa híbrido e oferece um desempenho que anteriormente só era disponível com espectrômetros de massa FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), instrumentos maiores e mais caros. A tecnologia ORBITRAP permitiu a difusão de espectrômetros de massa com ultra-alta resolução e massa exata, e rapidamente se tornou uma ferramenta essencial em muitas áreas. Os espectrômetros de massa ORBITRAP são encontrados em laboratórios de referência em proteômica no mundo todo, onde são empregados para identificar tanto as proteínas intactas como as enzimaticamente digeridas, encontrar proteínas que sofreram modificação química e identificar o tipo e localização da modificação pós-tradução. Espectrômetros de massa Orbitrap têm sido referenciados em centenas de artigos em revistas científicas, pois é um aparelho de alta precisão para identificação de expressão proteica levando a resultados mais precisos.

3.3.5 Análise dos dados

Os arquivos brutos .raw gerados pelo espectrômetro de massa LTQ Velos Orbitrap ETD acoplado ao cromatografo líquido nLCII ambos da Thermo Fisher™ foram convertidos pelo programa MSConvert para o formato .mzML que é um formato padronizado para espectrometria de massa^{251,252}. Estes arquivos foram carregados no programa R para as análises subsequentes²⁵³. Utilizando o pacote MSnbase foi feita a identificação e quantificação das proteínas em cada amostra, a identificação utilizou o arquivo

uniprot_sprot.fasta de www.uniprot.org/downloads, selecionando apenas as proteínas identificadas como humanas como referência e o método escolhido para quantificação foi o "SIN" (normalised spectral index)^{254,255}.

3.3.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi feito um filtro não específico removendo as proteínas que estivessem presentes em menos de 20% das amostras do grupo analisado. O teste estatístico utilizado foi o teste-t pareado, pois as amostras foram coletadas do mesmo paciente em diferentes situações biológicas. Como resultado final foram selecionadas as proteínas que possuíam p-valor menor que 0,01.

Foram gerados clusters hierárquicos para demonstrar as proteínas hiper e hipoexpressas. As proteínas que apresentam a cor vermelha no cluster hierárquico tem maior intensidade na amostra e conseqüentemente são as proteínas hiperexpressas. Já a coloração verde são as que apresentam menor intensidade e conseqüentemente, apresentam hipoexpressão.

4. RESULTADOS

4.1 Análise proteômica baseada em espectrometria de massas associada à microdissecção a laser

Foram coletadas 78 amostras de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço. Dessas, foram selecionadas 37 amostras de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Laringe e após análise anatomopatológica 13 pacientes foram selecionados para uso neste trabalho. Os dados referentes as amostras utilizadas encontram-se sumarizados no quadro 1.

Quadro 1: Dados referentes as amostras utilizadas neste trabalho

Paciente	Sexo	Idade na coleta	Localização do tecido coletado			T N M
			Tecido Normal (N)	Tecido Displásico (DM)	Tecido Tumoral (T)	
6	Masculino	58 anos	Banda ventricular esquerda	-----	Banda ventricular direita	T4 N0 MX
9	Feminino	55 anos	Epiglote	-----	Epiglote	T2 N2 MX
32	Masculino	77 anos	Prega vocal direita	-----	Prega vocal esquerda	T2 N0 MX
36	Masculino	63 anos	Banda ventricular direita	Prega vocal esquerda	-----	T2 N0 MX
38	Masculino	60 anos	Seio piriforme direito	Seio piriforme direito	Seio piriforme esquerdo	T4 N2 MX
41	Feminino	48 anos	Prega vocal esquerda	-----	Prega vocal direita	T1 N0 M0
43	Masculino	49 anos	Supraglote esquerda	-----	Supraglote direita	T4 N2 MX
50	Masculino	52 anos	-----	Supraglote esquerda	Prega vocal esquerda	T3 N0 MX
52	Masculino	54 anos	Supraglote direita	-----	Supraglote esquerda	T3 N1 M0
56	Masculino	57 anos	Aritenóide direita	Aritenóide direita	-----	T2 N0 MX
62	Masculino	59 anos	Banda ventricular esquerda	-----	Prega vocal direita	T3 N0 MX
69	Masculino	53 anos	Supraglote	-----	Supraglote	T4 N2 MX
73	Masculino	59 anos	-----	Banda ventricular direita	Prega vocal esquerda	T2 N0 MX

Todos os pacientes analisados são fumantes e tem o hábito de ingerir bebida alcoólica. Vale ressaltar que as amostras dos pacientes 52 e 69 são recidivas, e que o paciente 69 passou por químico e radioterapia.

4.2 Análise estatística

Inicialmente foi realizada a análise geral das amostras, incluindo os 13 pacientes selecionados e as respectivas amostras incluindo tecido normal, displasia moderada e tecido tumoral. A análise 1 foi feita comparando a expressão proteica do grupo A versus grupo B como mostra o tabela 2.

Tabela 2: Amostras comparadas na análise 1.

Paciente	Grupo A	Grupo B
6 – Homem	6T	6N
9 – Mulher	9T	9N
32 – Homem	32T	32N
36 – Homem	36DM	36N
38 – Homem	38T	38N
41 – Mulher	41T	41N
43 – Homem	43T	43N
50 – Homem	50T	50DM
52 – Homem	52T	52N
56 – Homem	56DM	56N
62 – Homem	62T	62N
69 – Homem	69T	69N
73 – Homem	73T	73DM

Legenda: T: Tecido Tumoral, DM: Displasia Moderada, N: Tecido Normal.

Nesta análise, foram encontradas 7003 proteínas, sendo 19 com p-valor menor que 0,01. Dessas 13 proteínas hiperexpressas e 6 hipoexpressas no grupo A, as quais se encontram sumarizadas no quadro 2. O cluster hierárquico dessa análise está representado pela figura 5.

Quadro 2: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas encontradas na análise 1, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	5,536313	0,002235	Colágeno-estrutural
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	MACF1	2,839475	0,002601	Citoesqueleto-estrutural
Tenascin	TNC	4,274017	0,003366	Matriz extracelular – estrutural
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	PTPN1	0	0,003583	Sinalização de crescimento celular
Thymidine phosphorylase	TYMP	4,567275	0,003583	Fator angiogênico
U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	RRP9	32,93885	0,004	Síntese de ribossomos
Laminin subunit gamma-2	LAMC2	3,083465	0,005571	Matriz extracelular-adesão
Filamin-A	FLNA	3,167587	0,006007	Citoesqueleto-ligação com actina-membrana
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1	6,628542	0,006117	Regulação diferenciação e proliferação
Rho GTPase-activating protein 21	ARHGAP21	7,688688	0,006918	Ativador de GTPase e ligação proteica-transporte em organelas
CAD protein	CAD	4,398107	0,008104	Atua na síntese de pirimidinas
Beta-nerve growth factor	NGF	3,92352	0,008849	Regulação de crescimento e diferenciação de neurônios sensoriais
Zinc finger and BTB domain-containing protein 41	ZBTB41	2,475563	0,009218	Regulador de transcrição gênica
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	-6,42988	0,004731	Inibidor de proteases
BCL-6 corepressor	BCOR	-8,38833	0,004922	Proteína repressora de transcrição (apoptose)
Extracellular matrix protein 1	ECM1	-3,44335	0,006856	Angiogênese, formação óssea
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	-2,89424	0,007697	Processamento do RNA, transdução de sinais
Zinc finger CCCH domain-containing protein 6	ZC3H6	-5,71244	0,009108	Regulador de transcrição gênica
Paternally-expressed gene 3 protein	PEG3	-9,80951	0,009752	Regulador de transcrição gênica

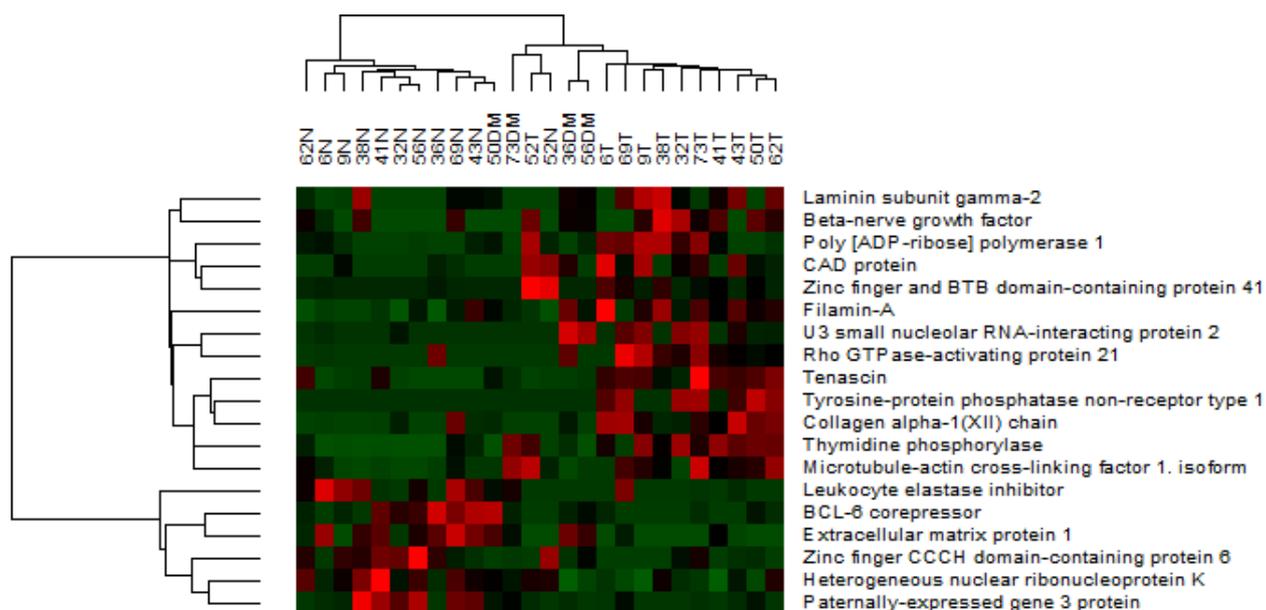


Figura 5: Cluster hierárquico análise 1.

Para uma análise pareada, selecionamos 7 pacientes que possuíam o pareamento entre tecido tumoral e normal adequados e chamamos de Pares Perfeitos (análise 2), esses pacientes estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3: Amostras comparadas na análise 2.

Paciente	Tecido Tumoral	Tecido Normal
6 – Homem	6T	6N
9 – Mulher	9T	9N
32 – Homem	32T	32N
38 – Homem	38T	38N
41 – Mulher	41T	41N
43 – Homem	43T	43N
62 – Homem	62T	62N

Legenda: T: Tecido Tumoral, N: Tecido Normal.

Na análise 2 foram encontradas 7099 proteínas no total, sendo 4 hiperexpressas e 5 hipoexpressas no tumor. Os resultados encontram-se no quadro 3 e o cluster hierárquico está representado pela figura 6.

Quadro 3: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 2, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Thymidine phosphorylase	TYMP	12,37777	0,000474	Fator angiogênico
Tenascin	TNC	3,092639	0,00353	Matriz extracelular – estrutural
60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	2,678226	0,00668	Síntese proteica
Myeloperoxidase	MPO	14,94347	0,007429	Sistema imunológico
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
Rho guanine nucleotide exchange factor 1	ARHGEF1	-48,924	0,002853	Ativador de GTPase e ligação proteica
Glutamine--tRNA ligase	QARS	-52,6561	0,005742	Síntese proteica
Antithrombin-III	SERPINC1	0	0,006257	Inibidor de proteases
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	-1,95918	0,006926	Síntese de ATP, regulação negativa de divisão celular
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	-4,03934	0,009688	Controle de expressão gênica, migração celular

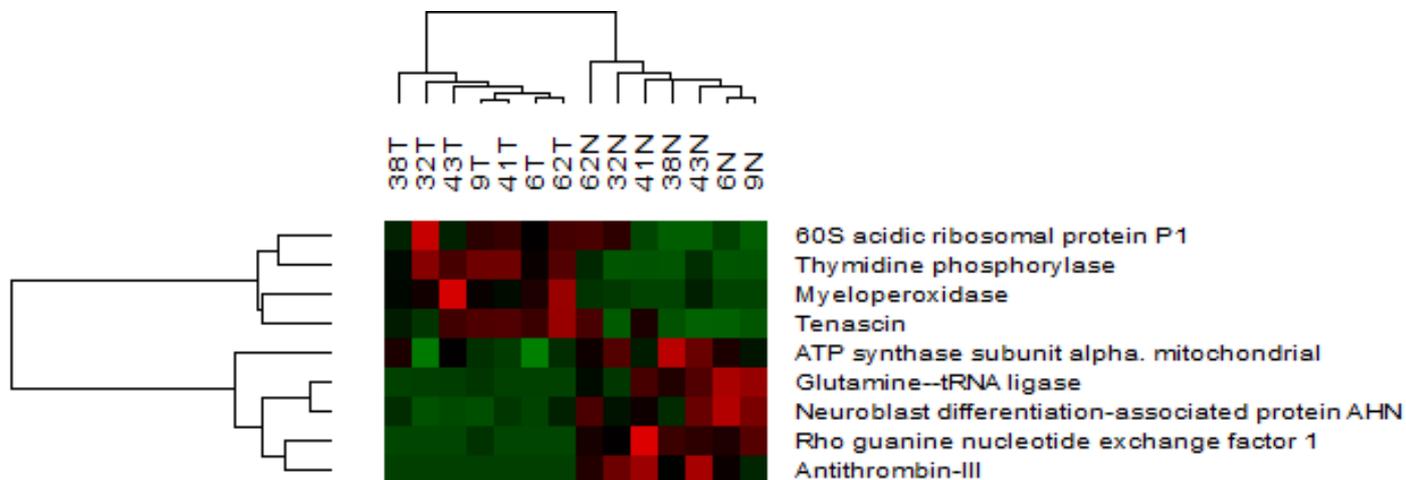


Figura 6: Cluster hierárquico análise 2.

Foram analisadas separadamente as amostras dos pacientes 52 e 69, por se tratarem de recidiva tumoral. A tabela 4 demonstra as amostras da análise 3.

Tabela 4: Amostras comparadas na análise 3.

Paciente	Tecido Tumoral	Tecido Normal
52 – Homem	52T	52N
69 – Homem	69T	69N

Legenda: T: Tecido Tumoral, N: Tecido Normal.

Foram encontradas 4842 proteínas, sendo 12 hiperexpressas no tumor e 14 hipoexpressas, como mostrado no quadro 4. Na figura 7 pode-se observar o cluster hierárquico referente a análise 3.

Quadro 4: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 3, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Kinectin	KTN1	7,172739	2,98E-05	Microtubulos e síntese proteica
Beta-arrestin-2	ARRB2	0	0,000248	Inibição de receptores
DNA repair-scaffolding protein	SPIDR	291,2663	0,000991	Reparo de Dna
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	GALNT12	0	0,002013	Glicosilação proteica
Phosphoglucomutase-2	PGM2	0	0,002947	Metabolismo de purinas, açúcares e carboidratos
Probable JmjC domain-containing histone demethylation protein 2C	JMJD1C	2,021728	0,003431	Regulação transcripcional
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	SLC5A13	6,419972	0,004091	Transportador transmembrana
Leucine-rich repeat-containing protein 28	LRRC28	0	0,004762	Sinalização da via Ras
Enhancer of polycomb homolog 1	EPC1	0	0,005117	Ativador transcripcional e repressor
40S ribosomal protein S8	RPS8	7,395578	0,006453	Síntese proteica
40S ribosomal protein S10	RPS10	1,585728	0,006684	Síntese proteica
Early endosome antigen 1	EEA1	7,281536	0,009608	Endocitose
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3	GUCY1A3	0	0,001331	Receptor de óxido nítrico
Nuclear receptor corepressor 1	NCOR1	-1,07335	0,001348	Repressor de transcrição
Deleted in autism protein 1	C3orf58	0	0,002918	Diferenciação celular
Paired box protein Pax-6	PAX6	0	0,004059	Regulação transcripcional

Protein S100-A11	S100A11	-1,8803	0,004124	Regula ciclo celular e diferenciação
Golgin subfamily A member 2	GOLGA2	-1,48734	0,004289	Forma Golgi
Uncharacterized protein C11orf95	C11orf95	0	0,005119	Desconhecida
Protocadherin gamma-A7	PCDHGA7	0	0,005195	Adesão celular
M-phase inducer phosphatase 1	CDC25A	0	0,006412	Progressão de G1 para S
COMM domain-containing protein 10	COMMD10	0	0,006478	Inibe fator transcrição
IgGFC-binding protein	FCGBP	0	0,007685	Imunidade
Protein LYRIC	MTDH	-3,76653	0,008149	Regulação transcripcional
TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1	TRAFD1	0	0,008392	Inibe resposta imune
Sorting nexin-17	SNX17	0	0,008406	Regulador de reciclagem endossômica

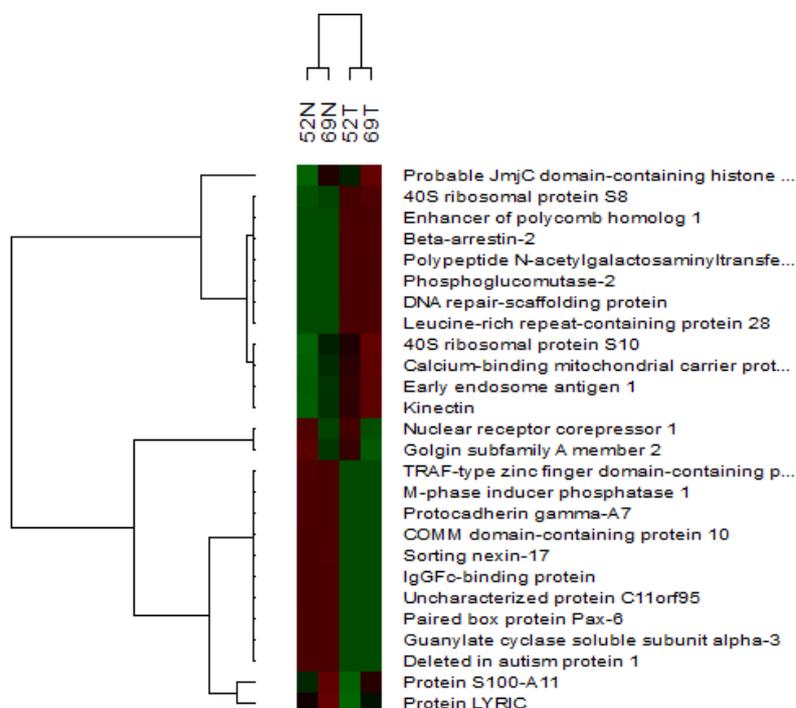


Figura 7: Cluster hierárquico análise 3.

Da análise 4, representada pela tabela 5, foi realizada a comparação de expressão proteica entre o tecido displásico e o tecido normal. Encontrou-se um total de 3951 proteínas, sendo 4 hiperexpressas e 5 hipoexpressas no tecido displásico. Os resultados da comparativa em questão, encontram-se no quadro 5 e o cluster hierárquico na figura 8.

Tabela 5: Amostras comparadas na análise 4.

Paciente	Displasia Moderada	Tecido Normal
36 – Homem	36DM	36N
38 – Homem	38DM	38N
56 – Homem	56DM	56N

Legenda: DM: Displasia Moderada, N: Tecido Normal.

Quadro 5: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 4, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase	TUT1	0	0,001053	Poli A polimerase
Integrator complex subunit 8	INTS8	4,146361	0,002332	Fator de transcrição
Zinc finger protein 655	ZNF655	0	0,007042	Regulação transcripcional
Nucleolar protein 58	NOP58	2,29368	0,009397	Forma ribossomo
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
Protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1	PP2D1	0	0,000695	Desconhecida
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	-4,70467	0,002915	Metabolismo de lipídeos
Zinc finger protein 544	ZNF544	0	0,004258	Regulação transcripcional
Ras-related protein Rab-12	RAB12	-2,08966	0,006325	Regulador de tráfico da membrana
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	-1,4022	0,008915	Transporte vesicular, degradação proteica

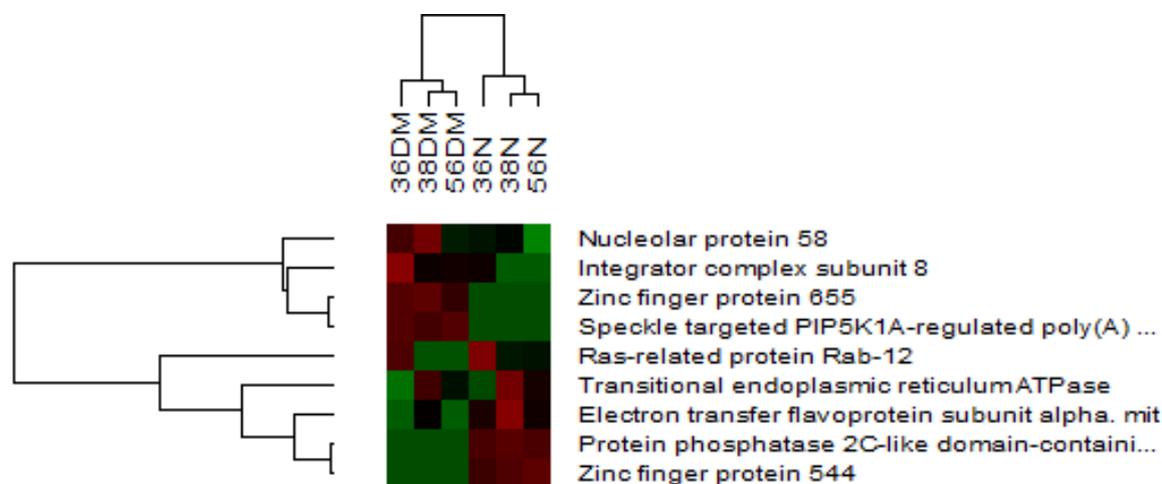


Figura 8: Cluster hierárquico análise 4.

Na análise 5, representada pela tabela 6, foi realizada a comparação de expressão proteica entre o tecido tumoral e o tecido displásico. Encontrou-se um total de 3847 proteínas, sendo 4 hiperexpressas e 2 hipoexpressas no tecido tumoral. Os resultados se encontram no quadro 6 e o cluster hierárquico na figura 9.

Tabela 6: Amostras comparadas na análise 5.

Paciente	Tecido Tumoral	Tecido Displásico
38 – Homem	38T	38DM
50 – Homem	50T	50DM
73 – Homem	73T	73DM

Legenda: T: Tecido Tumoral, DM: Displasia Moderada.

Quadro 6: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 5, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	2,962025	0,007291	Promove transcrição e promove angiogênese
Lung adenoma susceptibility protein 2	LAS2	4,625168	0,007646	Proliferação celular
Zinc finger protein 470	ZNF470	29,05398	0,007903	Regulação transcricional
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1	15,1406	0,009088	Formação de ribossomos e manutenção de telômeros
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
XK-related protein 2	XKRX	0	0,004819	Transportador de membrana
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	-1,13774	0,006515	Síntese proteica

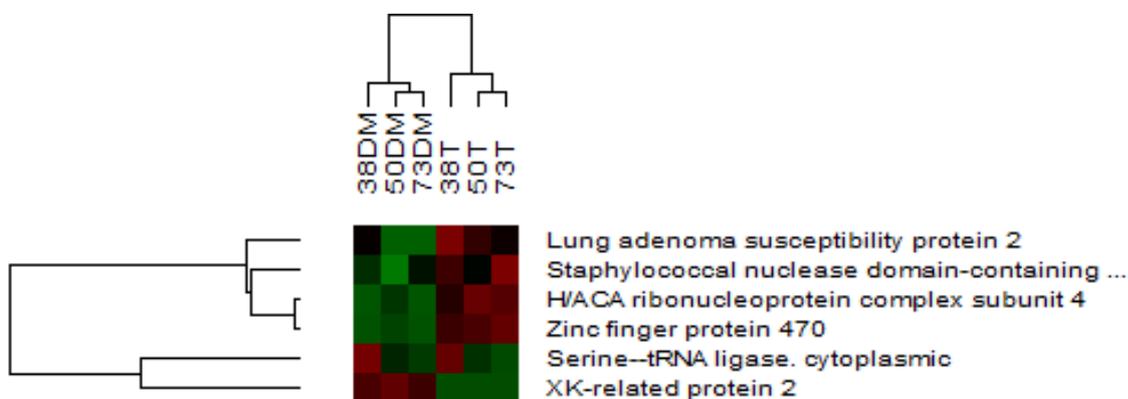


Figura 9: Cluster hierárquico análise 5.

Com relação a localização tumoral, analisando a expressão dos tumores localizados na prega vocal versus o tecido normal, conforme mostra a tabela 7, obtivemos um total de 3852 proteínas, sendo 9 hiperexpressas e 9 hipoexpressas no tecido tumoral da prega vocal, conforme consta o quadro 7, além do cluster hierárquico na figura 10.

Tabela 7: Amostras comparadas na análise 6.

Paciente	Tecido Tumoral	Tecido Normal
32 – Homem	32T	32N
41 – Mulher	41T	41N
62 – Homem	62T	62N

Legenda: T: Tecido Tumoral, N: Tecido Normal.

Quadro 7: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 5, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH	4,423654	0,0006	Processamento de carboidratos
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	2,089206	0,001996	Processamento de RNA
Prolargin	PRELP	2,261053	0,005148	Matrix de tecido conectivo extracelular
E3 ubiquitin-protein ligase RLIM	RLIM	0	0,005565	Regulação transcripcional
NF-X1-type zinc finger protein NFXL1	NFXL1	8,904087	0,00562	Sinalização molecular
Lactotransferrin	LTF	10,01265	0,005813	Transporte de ferro
Ras-GEF domain-containing family member 1C	RASGEF1C	0	0,006027	Ativador de GTPase
E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	CBLB	0	0,006356	Crescimento celular e migração
Myosin-11	MYH11	65,61684	0,009153	Contração muscular
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
ATP-binding cassette sub-family D member 1	ABCD1	0	0,000386	Transportador
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2	-5,76141	0,000998	Reparo de DNA
LINE-1 type transposase domain-containing protein 1	L1TD1	-9,21541	0,00238	Regulação transcripcional
Breast cancer type 2 susceptibility protein	BRCA2	-32,3722	0,002912	Reparo de DNA

PHD and RING finger domain-containing protein 1	PHRF1	-4,5908	0,004307	Fator transcripcional
T-cell activation inhibitor, mitochondrial	TCAIM	-2035,34	0,005692	Regulação de apoptose
KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like protein	KANSL1L	0	0,007969	Forma complexo de histona acetiltransferase
PAX3- and PAX7-binding protein 1	PAXBP1	-4,93635	0,008342	Ligante de fator transcripcional
Zinc finger matrin-type protein 1	ZMAT1	-9,97071	0,008367	Fator transcripcional

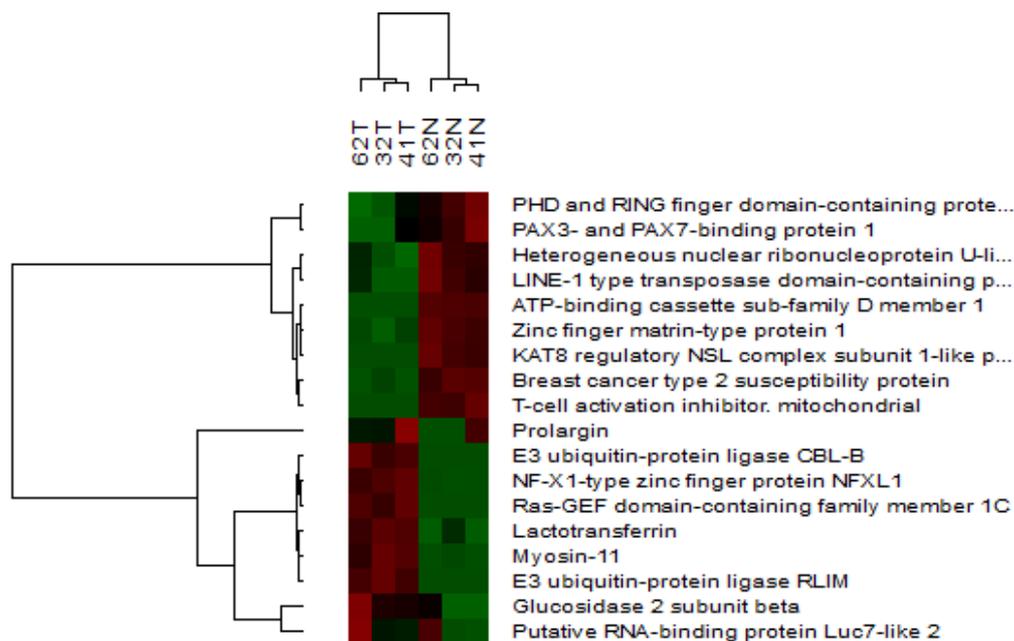


Figura 10: Cluster hierárquico análise 6.

Ainda com relação a localização tumoral, também foi analisada a expressão dos tumores localizados na prega vocal versus o tecido displásico correspondente, conforme mostra na tabela 8.

Tabela 8: Amostras comparadas na análise 7.

Paciente	Tecido Tumoral	Tecido Displásico
50 – Homem	50T	50DM
73 – Homem	73T	73DM

Legenda: T: Tecido Tumoral, DM: Displasia Moderada.

Como resultado dessa análise, foram encontradas um total de 4867 proteínas, sendo 12 hiperexpressas e 12 hipoexpressas no tecido tumoral da prega vocal, conforme demonstrado no quadro 8 e figura 11.

Quadro 8: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 7, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	ATG7	7,874488	0,000136	Regulação de ciclo celular
Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1	0	0,000888	Detoxificação celular
Acetyl-CoA carboxylase 1	ACACA	1,91549	0,001982	Síntese de ácidos graxos
Nipped-B-like protein	NIPBL	1,842406	0,002837	Coesão cromatídica
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	EIF3H	0	0,002895	Síntese proteica
Kinetochore-associated protein NSL1 homolog	NSL1	0	0,004329	Formação do cinetocoro
Zinc finger protein 316	ZNF316	5,682632	0,005049	Fator transcripcional
60S ribosomal protein L8	RPL8	0	0,00545	Síntese proteica
Peroxiredoxin-1	PRDX1	4,370567	0,006632	Cascata de sinalização de fator de crescimento
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	KCNH4	0	0,00709	transporte
Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein MGAT4D	MGAT4D	0	0,007788	Metabolismo de carboidratos
Integrin beta-4	ITGB4	1,751492	0,009531	Adesão e remodelamento celular, fator transcripcional
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
Protein FAM133B	FAM133B	-19,2854	0,00045	Desconhecida
Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	-3,33365	0,001465	Regulação transcripcional
Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1	-2,14002	0,002352	Síntese proteica
E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	TTC3	-1,75958	0,004005	Regulação transcripcional
Phosphomevalonate kinase	PMVK	0	0,00538	Codifica enzima peroxissomal
Retinoblastoma-like protein 2	RBL2	0	0,005973	Regulação transcripcional
Ribosomal biogenesis protein LAS1L	LAS1L	0	0,006326	Síntese proteica
Nance-Horan syndrome protein	NHS	-14,3985	0,007714	Regulação transcripcional
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2	POFUT2	0	0,00776	Desconhecida
Mitoferrin-2	SLC25A28	0	0,008039	Transportador mitocondrial de ferro
Extracellular sulfatase Sulf-1	SULF1	0	0,008772	Desconhecida
Protein FAM91A1	FAM91A1	-93,1395	0,008804	Desconhecida

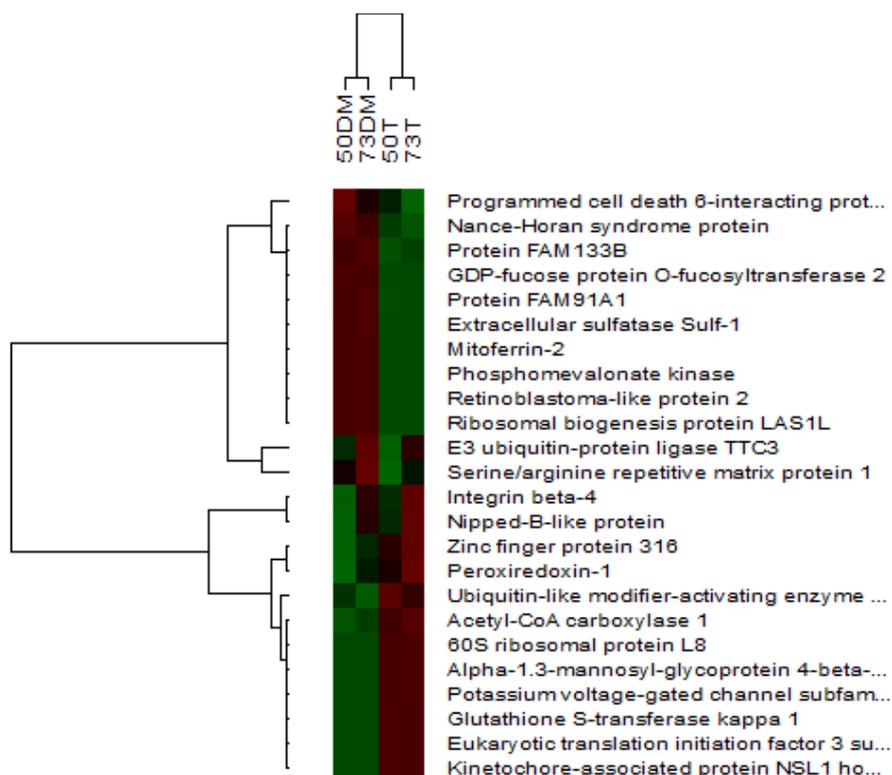


Figura 11: Cluster hierárquico análise 7.

Agrupamos na análise 8 (tabela 9) os tumores que estavam em outras localizações da laringe que não a prega vocal e comparamos a expressão no tecido tumoral versus tecido normal. Encontramos um total de 4817 proteínas, sendo 2 hiperexpressas e 5 hipoexpressas no tecido tumoral, conforme mostra o quadro 9. O cluster hierárquico está representado na figura 12.

Tabela 9: Amostras comparadas na análise 8.

Paciente	Tecido Tumoral	Tecido Normal
6 – Homem	6T	6N
9 – Mulher	9T	9N
38 – Homem	38T	38N
43 – Homem	43T	43N
52 – Homem	52T	52N

Legenda: T: Tecido Tumoral, N: Tecido Normal.

Quadro 9: Representa as proteínas hiper e hipoexpressas na análise 7, juntamente com o gene responsável pela codificação da proteína, o fold change (FC) e o inverso do fold change (Inv FC), valor de p (p-valor) e função da proteína encontrada.

PROTEÍNAS HIPEREXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	FC	p-valor	FUNÇÃO
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	PTPN13	4,40769	0,001895	Sinalização de crescimento celular
Thymidine phosphorylase	TYMP	12,28356	0,004587	Fator angiogênico
PROTEÍNAS HIPOEXPRESSAS				
PROTEÍNA	GENE	Inv FC	p-valor	FUNÇÃO
Glutamine--tRNA ligase	QARS	-47,0878	0,002251	Síntese proteica
Cadherin-1	CDH1	0	0,006321	Matriz extracelular-adesão
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	-4,94326	0,007113	Síntese proteica
Elongation factor 2	EEF2	-1,75548	0,007175	Síntese proteica
Periplakin	PPL	-25,8909	0,007755	Sinalização de crescimento celular

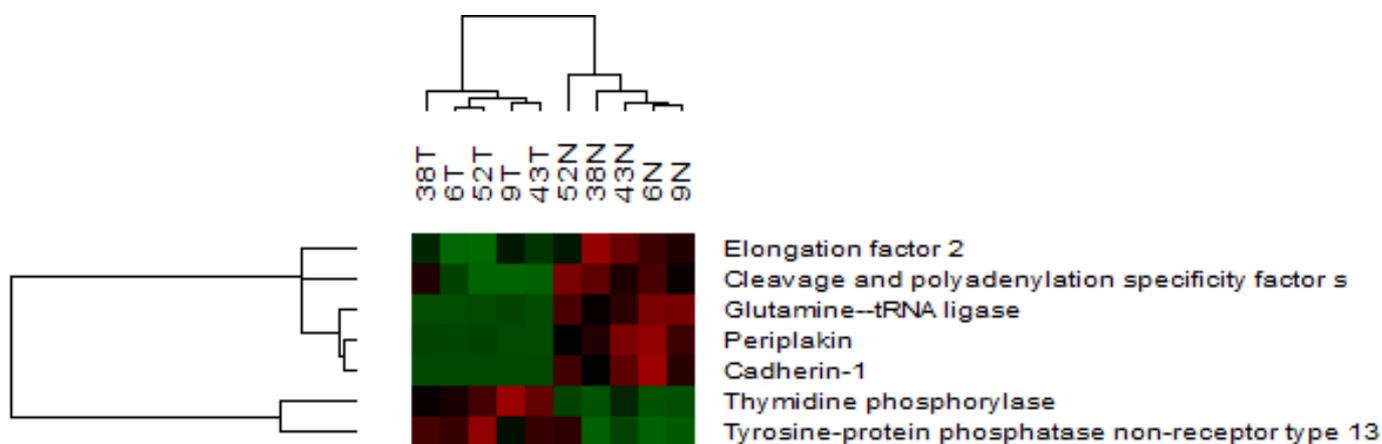


Figura 12: Cluster hierárquico análise 8.

5. DISCUSSÃO

Quando analisamos a expressão das proteínas na análise 1 referente as amostras dos 13 pacientes agrupados, verificamos a presença de 19 proteínas com valor de p menor que 0,01, sendo 13 hiperexpressas e 6 hipoexpressas no grupo A. Chama atenção a proteína *U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2* que é 32,93 vezes mais expressa no grupo A e a *Rho GTPase-activating protein 21* que é 7,68 vezes mais expressa também no grupo A e a proteína *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1* que não tem expressão nenhuma no grupo B. Podemos citar também as proteínas *BCL-6 corepressor* (8,38 x) e a *Paternally-expressed gene 3 protein* (9,80x) que apresentam hipoexpressão do grupo A.

No entanto, quando partimos para a análise 2 referente aos pares perfeitos, verificamos a expressão das amostras de pacientes que temos o pareamento do tecido tumoral versus tecido normal, e caímos para um total de 9 proteínas com valor de p menor que 0,01, sendo 4 proteínas hiper e 8 hipoexpressas no tecido tumoral. Sendo que as proteínas *Myeloperoxidase* (14,94x) e *Thymidine phosphorylase* (12,37x) estão mais expressa no tecido tumoral. Com relação a hipoexpressão temos a proteína *Antithrombin-III* que não se expressa no tecido tumoral e a *Glutamine--tRNA ligase* que apresenta uma expressão 52,65 vezes maior, além da proteína *Rho guanine nucleotide exchange factor 1* que está 48,92 vezes menos expressa no tecido tumoral.

A outra proteína hiperexpressa é a *60S acidic ribosomal protein P1* (2,67x) e as proteínas hipoexpressas são: *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial* (3,83x), *Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK* (16,31x).

Ao compararmos a análise 1 (grupo geral) x análise 2 (pares perfeitos) encontramos apenas 2 proteínas em comum: *Tenascin* e *Thymidine phosphorylase*. As duas proteínas se encontram hiperexpressas em ambas as análises, sendo respectivamente 4,27 e 4,56 vezes mais expressas no grupo A

da análise 1 e 3,09 e 12, 37 vezes mais expressas no tecido tumoral na análise 2.

Essa comparação entre a análise 1 e 2, grupo geral e pares perfeitos é importante porque quando analisamos os tecidos coletados como um todo, incluindo na mesma análise e pareando tecido tumoral x tecido normal, tecido displásico x tecido normal, tecido tumoral X tecido displásico e incluímos recidivas e tecido pós químico e radioterapia fazemos uma análise geral e encontramos um grande número de proteínas que tem uma variação individual na sua expressão. Com o pareamento diminuimos esse efeito, e com isso, facilitamos a identificação das proteínas que poderiam ser realmente consideradas biomarcadores. Além disso, utilizamos o p-valor menor que 0,01 ($p < 0,01$) para selecionar as proteínas que tiveram um efeito diferencial de expressão mais significativo.

Com isso, apesar de no grupo geral termos um maior número de proteínas, as proteínas que poderiam ter um maior potencial seriam as do grupo pareado.

Com relação as proteínas hiperexpressas encontradas na análise 2, temos:

✓ ***Thymidine phosphorylase***

A proteína *thymidine phosphorylase*, é codificada pelo gene *TYMP*, pertencente a família das timidinas fosforilases e localizado em 22 q13.33^{256,257}.

Este gene codifica um fator angiogénico, que promove a angiogénese in vivo e estimula o crescimento in vitro de uma variedade de células endoteliais, tendo um papel na manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Tem uma especificidade para células alvo altamente restrito que atua apenas sobre as células endoteliais. É responsável também por regular os níveis de timidina intracelulares e no plasma. As moléculas produzidas são então utilizadas como fontes de carbono e de energia ou no resgate de bases de pirimidina para a síntese de nucleótidos. Pode desempenhar um papel importante na progressão do tumor, evitando a apoptose induzida por hipoxia. A timidina fosforilase aumenta a invasão de células tumorais através da indução de genes relacionados com a invasão celular. A hiperexpressão dessa proteína é frequentemente relacionada a um prognóstico ruim e metástase^{257,258,259}.

A proteína *thymidine phosphorylase*, está envolvida com artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, aterosclerose, psoríase, glomerulonefrite crônica, encefalomiopatia mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE), síndrome do esgotamento do mitocondrial 1 (MTDPS1), além de tumores gastrointestinais, de mama, de bexiga e tumores de cabeça e pescoço²⁵⁸.

Em 2004 Hitt R et al., estudaram a combinação de cisplatina e capecitabina em pacientes com células escamosas de cabeça e pescoço ou recidivas, e os parâmetros foram correlacionados com a expressão de timidina fosforilase (TP), timidilato sintetase (TS), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) 1-3, e a densidade de microvasos (MVD). Foram escolhidos para o estudo pacientes que passaram por quimioterapia, químio e radioterapia concomitantes, ou pacientes que não haviam passado por nenhum tratamento prévio. Os pacientes receberam cisplatina e capecitabina por 3 semanas. Um total de 41 pacientes receberam 194 ciclos. No total, 16 respostas completas (39%) e 12 respostas parciais (29%) foram documentadas, para uma taxa de resposta global de 68%. A expressão citoplasmática de TP teve maior prevalência em pacientes com tumores de laringe se comparado as outras localizações, e em pacientes com recidiva se comparado com pacientes com tumores primários. Portanto concluíram que a combinação de cisplatina e capecitabina é eficaz tanto em tumores primários quanto em recidivas²⁶⁰.

Em 2008 Liu Y et al. estudaram a expressão da timidina fosforilase (TP), midkine (MK) e MVD marcado com anticorpo CD105 em carcinoma de células escamosas da laringe juntamente com seu significado clínico. Para isso analisaram por imuno-histoquímica 43 pacientes e correlacionaram com o estadiamento tumoral e metástase ganglionar. Concluíram que a metástase em linfonodo e MVD marcado com anticorpo CD105 foram fatores prognósticos independentes. Concluíram também que tanto a timidina fosforilase quanto a MK são importantes para a angiogênese em CEC de laringe, e estão intimamente correlacionados com o progresso deste tipo tumoral e a metástase em linfonodos. TP e MK podem afetar a progressão e prognóstico do tumor através da promoção da angiogênese. Sendo assim, sugerem que a detecção

combinada de TP, MK e CD105 podem ser valiosos marcadores tumorais e de fator prognóstico para o CEC de laringe²⁶¹.

Em 2009, Saito K et al. estudaram dois biomarcadores moleculares: timidina fosforilase (TP) e dihidropirimidina-desidrogenase (DPD). O objetivo do estudo foi avaliar se esses dois biomarcadores poderiam ser clinicamente útil e melhorar o resultado quimioterápico da capecitabina no tratamento de carcinoma de células escamosas do pescoço e cabeça humana. Para isso fizeram a transcriptase reversa de reação em cadeia da polimerase e determinaram os níveis de expressão de TP e DPD em diferentes linhas celulares de CEC. A relação TP/DPD foi calculada e comparada com a quimio-sensibilidade relativa entre as linhas celulares após tratamento com capecitabina. O efeito da expressão foi avaliado também em um modelo animal por imuno-histoquímica para detectar a expressão da DPP e TP in vivo. No entanto, não encontraram correlação entre a sensibilidade de capecitabina e os níveis de expressão relativa de TP ou DPD nas linhas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço testadas. Porém foi observada correlação significativa entre o TP e DPD contra a resistência aos medicamentos. Além disso, demonstram que a expressão do transgene de TP reforça significativamente o efeito tumoricida de capecitabina nesse tipo tumoral, este efeito anti-tumor foi observada até 30 dias após o tratamento. Com esses resultados, sugeriram que pacientes com CCECP poderiam ter um benefício maior usando quimioterapia à base de capecitabina se pudessem ser identificados através da análise do TP em relação a DPD nos seus tumores. Demonstaram também o potencial papel da terapia genética TP em relação à DPD para otimizar o efeito tumoricida de capecitabina²⁶².

A partir dos nossos resultados e dos artigos acima citados, podemos sugerir que essa proteína seja usada como biomarcador de progressão tumoral.

✓ **Tenascin**

A proteína *tenascin* pertence a família das tenascinas e é codificada pelo gene *TNC* localizado em 9q33.1^{263,264}. Tem função estrutural e é uma glicoproteína de matriz extracelular que tem um papel importante na remodelação de tecidos, implicando na orientação dos neurónios, bem como

migrando axônios durante o desenvolvimento, plasticidade sináptica, bem como a regeneração neuronal²⁶³. Essa proteína tem a capacidade de aumentar a migração e invasão das células cancerígenas já que estimula a proliferação de células de tumorais. Ela se expressa em torno dos vasos angiogênicos em muitos tumores e há evidências de que promove e regula a angiogênese in vitro e in vivo²⁶⁵. Sendo assim ela se expressa em tumores em geral. Além disso, em pacientes com glioma, estudos clínicos revelaram uma inibição da angiogênese do tumor através da aplicação de anticorpos dirigidos contra a tenascina C²⁶⁶. Para câncer de pulmão, cólon e cérebro, a hiperexpressão da *tenascin* correlaciona-se com um prognóstico ruim, enquanto que em outros tipos tumorais ainda não existe uma correlação clara entre a *tenascin* e a taxa de sobrevida ou malignidade tumoral²⁶⁴. Na busca de novos biomarcadores tumorais, seja de diagnóstico ou de prognóstico, os níveis de *tenascin* foram muitas vezes analisados em soro de pacientes com câncer e o seu valor como potencial biomarcador foi avaliado, porém embora fossem encontrados níveis séricos elevados dessa proteína sua utilização como biomarcador ainda é questionável, já que sua expressão também está correlacionada com inflamação e ou infecção²⁶⁴.

Yoshida T et al. já concluíram através de um estudo com displasia e células de carcinoma de laringe, que a proteína *tenascin* está envolvida na proliferação e migração celular²⁶⁷.

Juhász A et al. 2000, estudou o padrão de expressão de *tenascin* na progressão de tumores de laringe e hipofaringe, já que a sua expressão e distribuição pode ter uma influência significativa sobre a proliferação e invasão de células tumorais. Em tumores de laringe foi encontrada na fase inicial de crescimento uma acentuada produção de *tenascin*, que em fase posterior também foi encontrada, porém com maior significância. Já nos tumores de hipofaringe, essa produção foi encontrada hiperexpressa já em fase muito precoce do desenvolvimento tumoral. Concluíram então que o acúmulo de *tenascin* nos vasos sanguíneos tumorais é um indicativo de prognóstico desfavorável²⁶⁸.

Em 2000, Goussia AC et al. estudaram a expressão da *tenascin* (TN), em 35 pacientes com carcinoma invasivo de laringe, 12 com carcinoma in situ, 41 com displasias, 10 com papiloma e 18 casos com queratose, utilizando

anticorpo monoclonal TN2 em tecido embebido em parafina. A expressão de TN foi correlacionada com a expressão de fibronectina, CD44 e proteínas catepsina D (CD), com os índices de proliferação Ki-67 e proteína nuclear de proliferação celular (PCNA), bem como com as variáveis clínico-patológicas convencionais. Os tumores mostraram uma expressão mais significativa se comparado com as lesões benignas. O mesmo aconteceu quando comparados carcinoma invasivo com carcinoma in situ. No entanto a relação de expressão de TN com o grau histológico e atividade proliferativa foi insignificante. Concluiu-se com este trabalho que a expressão de TN pode estar envolvida no mecanismo de desenvolvimento de lesões da laringe e pode ajudar a prever o risco de progressão de lesões pré-cancerígenas do tumor²⁶⁹.

Zhang S et al. 2002, investigaram a expressão da proteína *tenascin* em lesões epiteliais de laringe, explorando sua relação com este tipo de tumor. Para isso usou o método de imuno-histoquímica em 4 pacientes com leucoplasia de laringe, 8 com papiloma, 7 com carcinoma in situ e 39 com carcinoma de células escamosas de laringe. Após as análises, não encontrou expressão dessa proteína nos pacientes com leucoplasia e papiloma. Nos pacientes com carcinoma in situ foi observada uma pequena mancha e nos pacientes com carcinoma de células escamosas foi observada uma mancha muito mais forte. Foi observada ainda a expressão entre os diferentes estádios de T e grau histológico do tumor, que se demonstraram insignificantes. No entanto foi encontrada significância nos casos com metástases em linfonodos se comparados com aqueles sem metástase ganglionar. Concluíram então que a expressão da *tenascin* pode estar envolvida na oncogênese e metástases do carcinoma de células escamosas da laringe²⁷⁰.

Na nossa amostra esse padrão de expressão também foi observado, já que temos hiperexpressão dessa proteína nos tumores analisados. Em especial na análise 2, observamos que a presença dessa proteína no grupo tumoral é 3,09 vezes maior que no grupo das células normais. Portanto, nosso estudo reforça essa hipótese.

Charalabopoulos K et al. em 2005, estudaram a expressão e distribuição das integrinas, moléculas de adesão em pacientes com carcinoma de células escamosas da laringe. Após a transformação da célula normal em célula tumoral, foram observadas várias alterações nas moléculas de adesão,

especialmente a despolarização de algumas integrinas, como alpha6beta4, alpha3beta1, alpha2beta1, bem como a presença de alpha6beta1 integrina no epitélio da célula tumoral. Além disso, a regulação positiva da integrina alpha5beta1 é um fator prognóstico negativo. Em casos de câncer de laringe, essa desorganização dos componentes da membrana basal (lamininas 1 e 5, colágeno tipo IV, tenascina, fibronectina), que representam integrinas ligantes, foi encontrado. Isto é devido à destruição parcial ou completa da membrana basal, que permite assim o extravasamento e a migração das células tumorais. Esses fenômenos foram observados em maior grau em tumores mostrando um prognóstico ruim, induzindo a pensar que estes danos são importantes no processo tumoral. Dessa forma concluíram que embora esse processo seja de extrema importância, ainda são necessários mais estudos para estabelecer essa proteína como um possível biomarcador para o diagnóstico precoce do câncer de laringe e alcançar a decisão sobre as estratégias terapêuticas adequadas no cuidado desses pacientes²⁷¹.

✓ **60S acidic ribosomal protein P1**

A *60S acidic ribosomal protein P1* desempenha um importante papel da síntese de proteínas. Pertence a família das proteínas ribossomais L12P, é codificada pelo gene *RPLP1* que se localiza em 15q23^{272,273,274}.

Este gene codifica uma fosfoproteína ribossomal que é um componente da subunidade 60S. Ao contrário da maioria das proteínas ribossomais, que são básicas, a proteína codificada em questão é ácida. A sua extremidade C-terminal é quase idêntica as extremidades C-terminais da fosfoproteínas ribossomais P0 e P2. A proteína P1 pode interagir com P0 e P2 para formar um complexo pentamérico que consiste em dímeros P1 e P2, e um monômero P0. A proteína está localizada no citoplasma. Duas variantes de splicing alternativo de transcritos que codificam proteínas diferentes foram observados. Tal como é típico para os genes que codificam proteínas ribossomais, existem vários pseudogenes processados deste gene disperso em todo o genoma²⁷⁵.

Alguns trabalhos já descreveram essa proteína como possível biomarcador para melanoma²⁷⁶. Foi descrito também em tumores de mama, próstata, ovário e em tumores de colon^{277,278,279}.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidência a expressão dessa proteína.

✓ ***Myeloperoxidase***

A *myeloperoxidase* é uma proteína que atua no sistema imunológico. Pertence a família das peroxidases e é codificada pelo gene *MPO*, localizado em 17q22^{280,281,282}.

Sendo essa proteína ligada ao sistema imunológico, espera-se que tenha hiperexpressão na presença do tumor, já que o organismo responde a invasão celular.

Já com relação as proteínas hipoexpressas temos:

✓ ***Rho guanine nucleotide exchange factor 1***

Essa proteína é codificada pelo gene *ARHGEF1*, localizado em 19q13.2^{283,284}. Tem função ativadora de GTPase e realiza as ligações proteicas²⁸⁵. Além disso, estimula o intercâmbio de nucleotídeos guanina para Rac e Rho, tem um papel fundamental em diversos processos celulares que são iniciados por estímulos extracelulares que funcionam através de receptores acoplados a proteína G, regula a migração e adesão de células B da zona marginal, e esta regulação parece ser necessária para estas células para contribuir para a resposta de anticorpos a antígenos TD, é exigido pelas células T para o desenvolvimento de hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação^{285,286}.

Portanto caso ocorra a inativação dessa proteína, a resposta imunológica será diminuída e o crescimento tumoral aumentado, dessa forma a hipoexpressão pode ser um indicativo de mau prognóstico.

✓ ***Glutamine--tRNA ligase***

A *glutamine--tRNA ligase* é codificada pelo gene *QARS*, localizado em 3p21.31^{287,288}. Sua principal função é síntese proteica, mas desempenha um papel crítico no desenvolvimento do cérebro, sendo altamente expresso no córtex cerebral do feto, particularmente na zona ventricular, zona subventricular interior, zona subventricular exterior e placa cortical, devido a isso está

envolvida na microcefalia progressiva com convulsões e atrofia cerebral e cerebelar (MSCCA)^{288,289}.

Essa proteína também se encontra hipoexpressa na análise 8, sendo esse o primeiro estudo a relatar a hipoexpressão da proteína *glutamine--tRNA*.

✓ ***Antithrombin-III***

A proteína *antithrombin-III* (AT-III) é membro da superfamília das serpinas e é codificada pelo gene *SERPINC1*, localizado em 1q25.1^{290,291}. É o mais importante inibidor de serina-protease do plasma, inibe a trombina, bem como outras proteases de serina ativadas do sistema de coagulação, e regula a cascata de coagulação sanguínea. AT-III inibe a trombina, matriptase-3 / TMPRSS7, bem como factores IXa, Xa e XI-A. A sua atividade inibitória é muito aumentada na presença de heparina^{292,293}. Está relacionada a deficiência de antitrombina III (AT3D).

Estudos sugerem que a Antithrombin-III possa ser usada como biomarcador preditivo para meningiomas, tumores gástricos e hepatocelular^{294,295,296}.

Com relação aos tumores de laringe, apenas um trabalho foi encontrado, porém foi estudado em soro em pacientes com esse tipo tumoral, o que não nos permite fazer comparações.

✓ ***ATP synthase subunit alpha, mitochondrial***

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial é uma proteína codificada pelo gene *ATP5A1* localizado em 18q21.1^{297,298}. Este gene codifica uma subunidade da ATP da sintase mitocondrial e catalisa a síntese de ATP, utilizando um gradiente eletroquímico através da membrana interna durante a fosforilação oxidativa. Dessa forma, sua função principal é síntese de ATP e regulação negativa de divisão celular^{299,300}.

Está expressa em tecidos como pulmão, coração, fígado, intestino e rim e em níveis mais elevados no cérebro fetal, retina e medula espinhal³. Está ligada a deficiência de fosforilação oxidativa 22 (COXPD22)²⁹⁹.

O nosso estudo é o primeiro a relatar a hipoexpressão dessa proteína.

✓ ***Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK***

A *neuroblast differentiation-associated protein AHNAK* é expressa pelo gene também chamado de *AHNAK*, localizado em 11q12.3^{301,302}. Sua função é atuar no controle de expressão gênica e migração celular, já que está envolvido em vias de transdução de sinal, também está envolvido com a sinalização de cálcio por meio de interações proteína-proteína e tem função crítica durante a resposta CTL, que normalmente é necessária para combater o câncer ou infecções virais³⁰³.

Dumitru CA et al. em 2013, estudaram o papel de AHNAK na fisiopatologia de 83 tumores de laringe com relação a sobrevida global e concluíram que que hiperexpressão dessa proteínas está associada a menor taxa de sobrevida³⁰⁴.

No entanto na nossa amostra essa proteína se apresentou hipoexpressa, resultado contrário ao estudo acima citado.

Em 2014 Weller P et al., estudaram AHNAK como marcador tumoral para câncer de laringe e concluíram que tinha valor prognóstico muito forte se comparado a outros marcadores³⁰⁵.

Portanto para essa proteína em especial, ainda são necessários mais estudos para concluir se pode ser realmente usada como biomarcador.

Foi realizada também uma análise dos pacientes com recidiva tumoral, a análise 3. Nessa análise foram encontradas 26 proteínas, sendo 12 hiper e 14 hipoexpressas no tecido tumoral. Vale chamar a atenção para as proteínas codificadas pelos genes *ARRB2*, *GALNT12*, *PGM2*, *LRRC28* e *EPC1*, que estão hiperexpressas no tecido tumoral, não apresentando expressão no tecido normal. Já as proteínas codificadas pelos genes *GUCY1A3*, *C3orf58*, *PAX6*, *C11orf95*, *PCDHGA1*, *CDC25A*, *COMMD10*, *FCGBP*, *TRAFD1* e *SNX17* não se expressam no tecido tumoral.

Nessa análise vale ressaltar também a presença da proteína *DNA repair-scaffolding protein*, codificada pelo gene *SPIDR*, cuja função principal é reparo de DNA, que se encontra 291,26 vezes mais expressa no tecido tumoral.

Ao correlacionar nossos dados com as informações descritas na literatura, percebemos que com relação as proteínas hiperexpressas

codificadas pelos genes *KTN1*, *ARRB2*, *SPIDR*, *GALNT12*, *PGM2*, *JMJD1C*, *SLC5A13*, *LRRC28*, *EPC1*, *RPS8*, *RPS10*, *EEA1* e as proteínas hipoexpressas codificadas pelos genes *GUCY1A3*, *NCOR1*, *C3orf58*, *PAX6*, *GOLGA2*, *C11orf95*, *PCDHGA7*, *COMMD10*, *FCGBP*, *TRAFD1*, *SNX17* este trabalho é o primeiro a relatar a variação de expressão em recidiva tumoral de laringe.

Para as proteínas codificadas pelos genes *S100A10*, *CDC25A* e *MTDH*, foram encontrados trabalhos relacionados com câncer de laringe, porém nenhum deles relata a interação com recidiva tumoral, sendo novamente nosso estudo o primeiro a fazer esse relato. Abaixo o que encontramos na literatura.

✓ **Protein S100-A11**

A *protein S100-A11*, pertence a família S-100 e é codificada pelo gene *S100A11*, localizado em 1q21.3^{306,307}. É responsável pela regulação celular, facilitando a diferenciação e a cornificação de queratinócitos^{306,308}. Está associada ao câncer colorretal, câncer pancreático e câncer de mama.

Foi encontrado apenas um artigo de 2013 sobre laringe, onde Wang C et al. propuseram estudar a proteína S100A11 em tumores de laringe, já que sua função exata neste tipo tumoral ainda é desconhecida. Para isso, analisaram tumores primários e tecidos tumorais adjacentes de carcinoma de células escamosas de laringe por *Western Blot* e transcrição reversa semi-quantitativa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) ou PCR quantitativo em tempo real, (Q-RT-PCR), respectivamente. A proliferação celular, a formação de colônias, os ensaios de migração e cicatrização foram realizados para avaliar se o siRNA poderia influenciar o comportamento biológico de carcinoma de laringe humano em células Hep-2 in vitro. Com isso verificaram que tanto os níveis de RNA como o da proteína S100A10 estavam hiperexpressos em tecido tumoral de laringe quando comparados ao tecido normal correspondente. Além disso, demonstraram também que a expressão dessa proteína poderia induzir a migração, mas não a proliferação das células Hep-2 usadas in vitro. Com esses resultados destacaram a importância de S100A11 na progressão do câncer de laringe e sugeriram que a desregulação do S100A11 pode contribuir para a progressão metastática neste tipo tumoral³⁰⁹.

No nosso estudo essa proteína se apresentou hipoexpressa no tecido tumoral de pacientes com recidiva de tumor de laringe.

✓ ***M-phase inducer phosphatase 1***

A proteína *M-phase inducer phosphatase 1* é membro da família das proteínas fosfatases e é codificada pelo gene *CDC25A* localizado em 3p21.31^{310,311}. Sua principal função é induzir a mitose, progressão da fase G1 para a fase S³¹⁰.

A hiperexpressão de *CDC25A* foi associada com menor sobrevida global para pacientes com câncer de mama, além disso, pode ser usado como biomarcador confiável para prever o prognóstico em mulheres com câncer de mama peri e pós-menopausa³¹². Estudo sugere que *CDC25A*, pode ser considerado um novo biomarcador para prever a eficácia da radioterapia em pacientes com tumor colorretal³¹³.

A respeito dos tumores de laringe, foram encontrados dois estudos, ambos de 2007 e do mesmo grupo. O primeiro tem como objetivo avaliar os níveis de expressão de *CDC25A*, *CDC25B*, os parâmetros clínicos e tempo de sobrevida global de pacientes com carcinoma de células escamosas de laringe. Para isso usaram 46 blocos de parafina de tecido de pacientes que fizeram cirurgia para a retirada do tumor e utilizaram anticorpos policlonais contra *CDC25A* e *CDC25B* para examinar a expressão das proteínas. A expressão de antigénio Ki-67 foi usada como um marcador de proliferação celular. O grupo controle foi composto por 21 amostras de mucosa normal. Não encontraram correlação significativa entre as análises e nenhuma das proteínas foi relacionada com o tempo de sobrevida global. Dessa forma concluíram que a expressão de *CDC25A*, *CDC25B* e o marcador de proliferação Ki-67 não estão associados com prognóstico em carcinoma de células escamosas de laringe³¹⁴.

O outro estudo encontrado teve como objetivo avaliar os níveis expressão de ciclina E / A e *CDC25A* / B durante a carcinogênese de laringe. A expressão foi demonstrada usando imuno-histoquímica em 46 casos de pacientes com câncer de laringe, 23 displasias epiteliais e 21 amostras de mucosa normal. A hiperexpressão de ciclina A e *CDC25A* foi significativamente associada com a proliferação entre displasia. Já a hiperexpressão da ciclina E e *CDC25B* ocorre como um acontecimento tardio na transformação neoplásica. A expressão progressiva de proteínas suporta o modelo de várias etapas dos tumores de laringe. Os resultados indicaram possível papel de ciclina A, como um marcador que reflete a proliferação celular. Já para a proteína *CDC25A*,

sugere-se formação de células malignas em lesões pré neoplásicas de laringe³¹⁵.

No nosso estudo só tivemos essa proteína expressa em tecido normal.

✓ **Protein LYRIC**

Protein *LYRIC* é codificada pelo gene *MTDH*, localizado em 8q22.1^{316,317}. Atua no fator de transcrição, regulando negativamente a atividade do promotor SLC1A2 / EAAT2 quando expresso ativa o fator nuclear kappa-B (NF-kappa-B), além de promover o crescimento independente de ancoragem de melanócitos e astrócitos imortalizados que é um componente chave na expansão das células do tumor. Promove a metástase do pulmão e também tem um efeito sobre a metástase óssea e cérebro, possivelmente através do aumento das células tumorais no endotélio do órgão alvo³¹⁶.

Foi encontrado apenas um estudo entre essa proteína e câncer de laringe. Este estudo compara o padrão de expressão proteica em 176 tumores primários e 27 controles normais por imuno-histoquímica e correlaciona com os parâmetros clínicos. Os resultados demonstraram que 161 amostras (91,48%) de tumor primário expressou a proteína, e que nos controles não houve essa expressão. Além disso, a expressão da MTDH foi significativamente associada com o local primário do tumor, classificação de T, estadiamento clínico, metástase e recorrência. A análise de Kaplan-Meier revelou que a expressão de MTDH foi significativamente associada com pior sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com tumor. Os pacientes com metástase apresentaram alta expressão de MTDH. Finalmente, a análise multivariada demonstrou que a expressão de MTDH foi um fator prognóstico independente tanto para sobrevida global sem a doença como para a sobrevida com a doença. Concluíram então que a hiperexpressão de MTDH foi fortemente associada com o comportamento tumoral mais agressivo e pior prognóstico, indicando que MTDH é um biomarcador molecular valioso para a progressão deste tipo de tumor³¹⁸.

Novamente no nosso estudo só tivemos essa proteína expressa em tecido normal.

Ao compararmos essa análise com a análise 2, onde temos apenas tumores primários, observamos que as proteínas expressas são diferentes das

encontradas na análise 3, mostrando que o padrão de expressão da recidiva é diferente do padrão de expressão encontrado no tumor primário.

Pensando em tentar estabelecer uma conexão entre variação da expressão e a carcinogênese, avaliamos em separado a variação entre tecido displásico e tecido normal bem como tecido tumoral e tecido displásico.

Na análise 4, avaliamos tecido displásico X tecido normal, foram encontradas 9 proteínas, sendo 4 hiperexpressa e 5 hipoexpressas no tecido displásico, enquanto na análise 5 avaliamos tecido tumoral X tecido displásico, foram encontradas 6 proteínas, sendo 4 hiperexpressas no tecido tumoral e 2 hipoexpressas. E ao comparar as análises 4 e 5 observamos que as proteínas encontradas com p-valor menor que 0,01 são diferentes entre si.

Na análise entre tecido displásico e tecido normal, temos a hiperexpressão das proteínas *Integrator complex subunit 8* e *Nucleolar protein 58*, além da *Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase* e *Zinc finger protein 655* que se expressam somente no tecido displásico e a hipoexpressão das proteínas *Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial*, *Ras-related protein Rab-12* e *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* além da *Protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1* e *Zinc finger protein 544* que não se expressam no tecido displásico.

Já na análise entre tecido tumoral e tecido displásico, temos as proteínas *Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1*, *Lung adenoma susceptibility protein 2*, *Zinc finger protein 470* e *H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4* hiperexpressas no tecido tumoral e as proteínas *Serine--tRNA ligase, cytoplasmic* e *XK-related protein 2* hipoexpressas, sendo a última com expressão apenas no tecido displásico.

Assim, poderíamos pensar que quando o tecido é displásico teríamos maior expressão das proteínas codificadas pelos genes *INTS8* e *NOP58*, além de *TUT1* e *ZNF655*, sendo que no tecido tumoral a expressão dessas proteínas se estabilizaria e passaria a aumentar a expressão das proteínas codificadas pelos genes *SND1*, *LAS2*, *ZNF470* e *DKC1*. Por outro lado, teríamos a diminuição da expressão do tecido normal para o tecido displásico das proteínas codificadas pelos genes *ETFA*, *RAB12* e *VCP* além das proteínas codificadas pelos genes *PP2D1* e *ZNF544* em um passo seguinte, chegando a célula tumoral, teríamos a diminuição da expressão das proteínas codificadas

pelos genes *SARS* e *XKRX*. Sendo assim, essas proteínas poderiam ser utilizadas como marcadores para essas fases da tumorigênese.

A tabela 10 mostra as proteínas encontradas nos diferentes tecidos estudados nas análises 4 e 5, onde avaliamos respectivamente tecido displásico versus tecido normal e tecido tumoral versus tecido displásico .

Tabela 10: Proteínas encontradas nos diferentes tecidos estudados nas análises 4 e 5.

Tecido Normal		Tecido Displásico		Tecido Tumoral	
ZNF544	Apenas	ZNF655	Apenas	DKC1	ZNF470 Hipoeexpressão
PP2D1	Tecido Normal	TUT1	Tecido		
VCP	Hipoexpressão	XKRX	Displásico	SND1	no Tecido
		NOP58	Hiperexpressão		
RAB12	no Tecido	INTS8	no Tecido	LAS2	Displásico
ETFA	Displásico	SARS	Displásico		

✓ ***Integrator complex subunit 8***

A proteína *Integrator complex subunit 8* é codificada pelo gene *INTS8* localizado em 8q22^{319,320}. É uma subunidade do complexo integrador que está envolvido na clivagem de pequenos RNAs U1 e U2 nuclear³²¹. Está ligada com tumor neuroepitelial disembrionário, deficiência de lipoproteína lipase e a câncer gástrico em pacientes asiáticos^{321,322}.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidencia a expressão dessa proteína.

✓ ***Nucleolar protein 58***

A *Nucleolar protein 58* é codificada pelo gene *NOP58* localizado em 2q33.1^{323,324}. Esta relacionada com a biogênese da subunidade 60S ribossomal³²⁵. Sua principal função é a formação de ribossomos, necessário para a divisão celular. Associado ao câncer de pulmão, onde um estudo identifica pela primeira vez, em pacientes não fumantes com adenocarcinoma de pulmão, mutações germinativas específicas que podem predispor a este tumor³²⁶.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidência a expressão dessa proteína.

✓ ***Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase***

A proteína *Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase* é codificada pelo gene *TUT1* localizado em 11q12.3^{327,328}. Controla expressão gênica e proliferação celular³²⁹. Há um estudo que sugere que *TUT1* possa atuar como supressor tumoral para o osteossarcoma³³⁰.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidência a expressão dessa proteína.

✓ ***Zinc finger protein 655***

Zinc finger protein 655 é codificada pelo gene *ZNF655*, localizado em 7q22.1^{331,332}. Pertence a família das proteínas krueppel C2H2-type zinc-finger e está envolvida na regulação da transcrição, na ligação de DNA e nas interações proteína – proteína³³³.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidência a expressão dessa proteína.

✓ ***Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1***

A *Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1* é codificada pelo gene *SND1* localizado em 7q32.1^{334,335}. É uma proteína multifuncional, envolvida na regulação da transcrição, splicing e metabolismo do RNA. Funciona como um fator de ligação entre STAT6 e fator de transcrição basal, e como co-ativador de transcrição para o Epstein-Barr vírus antígeno nuclear 2 (EBNA2), estando relacionando com sua via de infecção viral^{334,336}. Está relacionado também com a via de carcinogênese³³⁶.

A expressão de *SND1* tem sido observada em vários tumores, incluindo tumores do cólon, mama, próstata e carcinoma hepatocelular, indicando um papel positivo dessa proteína na iniciação e progressão do tumor³³⁷. Outros estudos ligam essa proteína com adenocarcinoma de pulmão e glioma, além dos já descritos acima, destacando *SND1* como potencial alvo terapêutico³³⁸.

Um estudo de 2009 de Kuruma H et al., confirma a expressão de *SND1* em células de câncer de próstata utilizando a técnica de hibridização in situ.

Observaram a expressão de SND1 em 60 dos 62 casos estudados e concluíram que essa proteína é hiperexpressa em células tumorais, com intensidade aumentada de acordo com o grau de agressividade tumoral, em contrapartida, em amostras hiperplásicas e em epitélio normal a intensidade teve fraca expressão e expressão negativa. Assim sendo pode ser considerado um biomarcador promissor e também alvo terapêutico³³⁹.

Já o trabalho de Blanco MA et al., 2011 sugere que SND1 é um mediador funcionalmente e clinicamente significativo de metástase para câncer de mama³⁴⁰.

Não há descrito na literatura estudos que liguem essa proteína a tumores de laringe, sendo o nosso o primeiro trabalho a evidenciar tal fato. O nosso trabalho mostra uma hiperexpressão dessa proteína no tecido tumoral em comparação com o tecido displásico, sugerindo que embora sejam necessários mais estudos a respeito, ela segue o mesmo padrão encontrado em outros tipos tumorais e por isso também pode ser sugerida como um marcador de progressão tumoral.

✓ ***Lung adenoma susceptibility protein 2***

A *Lung adenoma susceptibility protein 2* é codificada pelo gene *LAS2*, também conhecido como *C18orf54*, localizado em 18q21.2^{341,342}. Desempenha papel na proliferação celular e está associado com adenoma e infarto de miocárdio inferior^{342,343}.

Foi encontrado apenas um trabalho descrevendo a supressão de *LAS2* em adenocarcinoma de pulmão em ratos, o que implica que a perda de função de *LAS2* pode ser um passo-chave para a carcinogênese em pulmão³⁴⁴.

Uma vez que essa proteína está envolvida na proliferação celular, segundo nossos resultados em carcinoma de células escamosas de laringe há hiperexpressão no tecido tumoral, aumentando a divisão celular e consequentemente a proliferação.

✓ ***Zinc finger protein 470***

Zinc finger protein 470 é codificada pelo gene *ZNF470*, pertencente a família das proteínas krueppel C2H2-type zinc-finger, também conhecido como

CZF-1, localizado em 19q13.43^{345,346}. Está envolvida na regulação transcriptional³⁴⁵.

Se encontra em nossa amostra com hiperexpressão tumoral.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidência a expressão dessa proteína.

✓ ***H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4***

H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 é codificada pelo gene *DKC1* localizado em Xq28^{347,348}. É necessário para a biogênese do ribossomo, crescimento celular, proliferação e manutenção dos telômeros. É uma proteína altamente dinâmica ao longo do ciclo celular e aumenta os processos celulares fundamentais que são interrompidos por períodos de ausência da sua função normal³⁴⁹. Está associada com disqueratose congênita, ligada ao X (DKCX) e a síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HHS), além do aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer já que *DCK1* é um gene supressor tumoral³⁴⁷. Estudos sugerem a expressão em tumores de cólon, mama e próstata³⁴⁵⁰.

Estudos recentes identificaram regulação positiva do gene *DKC1* em associação com vários tumores esporádicos. Análises do genoma sugerem que *DKC1* pode ser regulada pela oncoproteína c-MYC. E está entre as proteínas mais comumente desreguladoras do câncer. O estudo de Alawi F et al. 2007, constatou que *DKC1* é alvo direto da transcrição de c-MYC e por isso sugere que *DKC1* está ligado a hiperexpressão de tumores³⁵¹.

Essa proteína se encontra 15,14 vezes mais expressa nas células tumorais de nossas amostras.

✓ ***Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial***

Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial é codificada pelo gene *ETF A* localizado em 15q24.2^{352,353}. Pertence a família da subunidade ETF alfa e é uma proteína transportadora³⁵³. É responsável por transferir elétrons para a principal cadeia respiratória mitocondrial via ETF desidrogenase³⁵⁴. Está ligada a acidúria gultárica 2A (GA2A)³⁵². Na nossa amostra essa proteína se encontrou hiperexpressa no tecido displásico se comparada ao tecido normal.

Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidência a expressão dessa proteína.

✓ ***Ras-related protein Rab-12***

Ras-related protein Rab-12 é codificada pelo gene *RAB12*, localizado em 18p11.22 e pertence a família do oncogene *RAS*^{355,356,357}. Desempenha papel no transporte de proteína a partir da reciclagem de endossomos para lisossomos³⁵⁷. Está associada ao câncer colorretal³⁵⁸.

Na nossa amostra essa proteína se encontrou hipoexpressa no tecido displásico se comparada ao tecido normal e é o primeiro relato sobre a evidencia da expressão dessa proteína em tumores de laringe.

✓ ***Transitional endoplasmic reticulum ATPase***

Transitional endoplasmic reticulum ATPase é codificada pelo gene *VCP*, localizado em 9p13.3^{359,360}. A proteína codificada por este gene é um membro de uma família que inclui proteínas de ligação a ATP envolvidos no transporte de vesículas e fusão. É uma proteína estrutural envolvida na formação do retículo endoplasmático de transição (TER). Utiliza a energia derivada da hidrólise de ATP para modificações conformacionais de proteínas alvo. É uma proteína essencial, tendo papel em diversos processos biológicos, como degradação associadas ao retículo endoplasmático, a fusão da membrana homotípica, controle transcricional, regulação do ciclo celular, autofagia e regulação da degradação de proteínas na membrana mitocondrial externa³⁶¹. Também envolvida na resposta a danos no DNA³⁶¹. Há estudos relatando a essa proteína com miopatia associada do corpo de inclusão com a doença de Paget do osso e demência fronto-temporal (IBMPFD), esclerose lateral amiotrófica (ELA), carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pâncreas, carcinoma de células escamosas gengival, carcinoma da tireóide, carcinoma de células não pequenas de pulmão, câncer gástrico, leucemia, osteossarcoma, síndrome de Werner, Doença de Machado-Joseph, hepatite, doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema, colesterol e imunidade antiviral³⁶⁰.

Na nossa amostra essa proteína se encontrou hipoexpressa no tecido displásico se comparada ao tecido normal, sendo o nosso o primeiro estudo a evidenciar a expressão dessa proteína em tumores de laringe.

✓ ***Protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1***

Protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1 é codificada pelo gene *PP2D1*, também conhecido como *C3orf48* localizado em 3p24.3^{362,363}. Sua função ainda é desconhecida³⁶⁴.

Na nossa amostra apresenta expressão apenas no tecido normal.

✓ ***Zinc finger protein 544***

Zinc finger protein 544 é codificada pelo gene *ZNF544* localizado em 19q13.43. Sendo sua principal função a regulação da transcrição^{365,366}.

Na nossa amostra apresenta expressão apenas no tecido normal, sendo este o primeiro estudo a evidenciar essa proteína em carcinoma de células escamosas de laringe.

✓ ***Serine--tRNA ligase, cytoplasmic***

A proteína *Serine--tRNA ligase, cytoplasmic* é codificada pelo gene *SARS*, família de tRNA amino-acilo classe II, localizado em 1p13.3^{367,368,369}. Sua função é catalisar a transferência de L-serina de tRNA³⁶⁹.

Essa proteína foi encontrada hipoexpressa no tecido tumoral em relação ao tecido displásico, ou seja, temos uma expressão maior no tecido displásico o que nos leva a sugerir que ela pode ser usada como um potencial biomarcador de displasia. Para tumores de laringe, nosso estudo é o primeiro que evidencia a expressão dessa proteína.

✓ ***XK-related protein 2***

XK-related protein 2 é codificada pelo gene *XKRX* localizado em Xq22.1^{370,371}. Essa proteína está relacionada com um componente do complexo XK/Kell do grupo sanguíneo Kell. A proteína codificada inclui vários domínios transmembranares e pode funcionar como um transportador de membrana³⁷².

Embora não existam artigos relacionando essa proteína a tumores, ela foi encontrada em nosso estudo com expressão apenas no tecido displásico se comparada com o tecido tumoral, o que nos leva a sugerir que mais estudos devam ser realizados e que ela pode ser usada como um potencial biomarcador de displasia.

Foi feita ainda uma análise separando as amostras por localização tumoral. Quando separamos a amostra por localização tumoral, encontramos uma variação diferente de proteínas. Encontramos um número maior de proteínas nas análises de tumores na prega vocal, 18 proteínas ao comparar tecido tumoral de prega vocal com tecido normal e 24 proteínas quando comparado o tecido tumoral da prega vocal com o tecido displásico, e apenas 7 proteínas quando comparado tecido tumoral de outras localizações da laringe com tecido normal.

6. CONCLUSÃO

Após as análises, podemos concluir que:

Poderiam ser biomarcadores para o carcinoma de células escamosas de laringe:

- Proteínas hiperexpressas:
 - Thymidine phosphorylase
 - Tenascin
 - 60S acidic ribosomal protein P1
 - Myeloperoxidase

- Proteínas hipoexpressas:
 - Rho guanine nucleotide exchange factor 1
 - Glutamine--tRNA ligase
 - Antithrombin-III
 - ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
 - Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK

Poderiam ser biomarcadores para a displasia laringe:

- Proteínas hiperexpressas:
 - Zinc finger protein 655
 - Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase
 - XK-related protein 2
 - Nucleolar protein 58
 - Integrator complex subunit 8
 - Serine--tRNA ligase, cytoplasmic

- Proteínas hipoexpressas:
 - Zinc finger protein 544
 - Protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1

- Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
 - Ras-related protein Rab-12
 - Transitional endoplasmic reticulum ATPase
 - H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
 - Zinc finger protein 470
 - Lung adenoma susceptibility protein 2
 - Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
- A expressão proteica do tumor primário parece ser diferente do tumor de recidiva.
- Parece haver uma variação na expressão proteica dos tumores localizados na prega vocal com relação as outras regiões.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nussbaum RI, McInnes RR, Willard HF. Genômica e Genética do Câncer. Nussbaum RI, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética Médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2008; 389-416.
2. Almeida AF, Alves RC, Felix JD, Castro DS, Zandonade E, Rocha RM. Quality of Life in Patients Suffering from Upper Aerodigestive Tract Cancer at a University Hospital. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2013; 59(2): 229-237.
3. Santiago MB, Marson AUL, Secolin R, Ribeiro D, Lima CSP, Bertzzo CS. SLC23A2-05 (rs4987219) and KRAS-LCS6 (rs61764370) polymorphisms in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Lett.* Jun 2014; 7(6): 1803–1811.
4. Ministério da Saúde. Mensagem aos Médicos. Câncer Fundamentos. Brasília: Secretaria de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer. 1971; 7-47.
5. Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e Agentes Antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova.* 2005; 28(1):118-29.
6. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. INCA, 2014.
7. Júnior JR. Oncogenese. *Oncologia Clínica.* 2ª ed. São Paulo: Sarvier Editora de livros médicos. 1984; 3-21.
8. Rocha JCC, Silva SN. Oncogenética. In: Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da Oncologia. 2. ed. São Paulo:TECMEDD. 2003; 423-432.
9. Ministério da saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação nacional de controle de tabagismo - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996.
10. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
11. Mendenhall WM, Riggs-Jr CE, Cassisi NJ. Cancer of the head and neck: treatment of head and neck cancers. In: DeVita-Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer Principles & Practice of Oncology.* 7.ed., Lippincott Williams & Wilks, 2005.,
12. Filho MR, Rocha BA, Pires MBO, Fonseca ES, Freitas EM, Junior HM, Santos FBG. Quality of life of patients with head and neck cancer. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79(1):82-8.
13. Moreno AB, Lopes CS. Avaliação da qualidade de vida em pacientes laringectomizados: uma revisão sistemática. *Cad Saúde Pública.* 2002; 18(1):81-92.
14. Araújo SSC, Padilha DMP, Baldisserotto J. Saúde bucal e qualidade de vida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Rev Fac Odontol Porto Alegre.* 2007;48(1/3):73-6.

15. Shah FD, Rasheedunnisa B, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, Patel PS. A Review on Salivary Genomics and Proteomics Biomarkers in Oral Cancer, *Ind J ClinBiochem*. Oct-Dec 2011, 26(4):326–334.
16. Messadi DV, Wilder-Smith P, Wolinsky L. Improving oral cancer survival: the role of dental providers. *J Calif Dent Assoc*. 2009; 37(11): 789-98.
17. Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJ, Slijper M. Protein biomarker discovery for head and neck cancer. *J Proteomics*. 2010; 73(10): 1790-803.
18. Flores IL. Potenciais biomarcadores para o carcinoma espinocelular oral identificados por microdissecção a laser associada a proteômica baseada em espectrometria de massas. [Dissertação – Mestrado]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, 2013.
19. Matta A, DeSouza LV, Shukla NK, Gupta SD, Ralhan R, Siu KW. Prognostic significance of head-and-neck cancer biomarkers previously discovered and identified using iTRAQ-labeling and multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2008; 7(5): 2078-87.
20. Borrebaeck CA. Viewpoints in clinical proteomics: when will proteomics deliver clinically useful information? *Proteomics Clin Appl*. 2012; 6(7-8): 343-5.
21. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/dados-estatisticos-sobre-o-cancer-de-laringe-e-orofaringe/7534/212/> - Acesso: 05 de Maio de 2015.
22. Chaikhoutdinov I, Goldenberg D. Impact of genetic targets on therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 2013;779:165–177.
23. Turksma AW, Bontkes HJ, van den Heuvel H, et al. Effector memory T cell frequencies in relation to tumour stage, location and HPV status in HNSCC patients. *Oral Dis*. 2013;19:577–584.
24. Holland JF, Frei E, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RCJ et al. *Cancer Medicine*. 6^o ed. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc. 2003.
25. Sidransky D. Molecular Biology of Head and Neck Tumors. In: De Vita JVT, Hellman S, Rosenberg AS. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 7^a ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2005; 653-662.
26. Bernardi D, Barzan L, Franchin G, Cinelli R, Balestreri L, Tirelli U. Treatment of head and neck cancer in elderly patients: state of the art and guidelines. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005; 53 (1): 71-80.
27. Mehrota R, Singh M, Kumar D, Pandey AN, Gupta RK, Sinha US. Age specific incidence rate and pathological spectrum of oral cancer in Allahabad. *Indian J Med Sci*. 2003; 57 (9): 400-4.
28. Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo. Tabnet. Prefeitura da cidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude>> Acesso: 30 março 2015.
29. Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a huGE review. *Am J Epidemiol*. 2004; 159 (1): 1-16.

30. Lin DT, Cohen SM, Coppit GL, Burkey BB. Squamous cell carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Otolaryngol Clin N Am.* 2005; 38: 59-74.
31. Maluf FC, Guimarães JLM, Rosa DD. Tumores da Cavidade Oral. Guimarães JLM, Rosa DD. *Rotinas em Oncologia.* Artmed. 2008; 133-140.
32. Condutas do INCA. Head and Neck epidermoid carcinoma *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2001, 47(4): 361-76.
33. Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN *et al.* A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem.* 2011; 26(4): 326-34
34. Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Clinic and epidemiologic characteristics in the with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70:35–40.2.
35. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 2006;24:2137–2150.
36. Visacri MB. Estudo das reações adversas, qualidade de vida e excreção de cisplatina na urina de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em quimioterapia e radioterapia. [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2013.
37. Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24(1):9-17.
38. Garnis C, Buys TPH, Lam WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol cancer.* 2004; 3(9): 3-9.
39. Mori S, Nose M, Morikawa H, Sato A, Saito T, Song ST *et al.* A novel evaluation system of metastatic potencial of oral squamous cell carcinoma according to the histopathological and histochemical grading. *Oral Oncol.* 1998; 34 (6): 549-57.
40. Franceschi S, Talamini R, Baria S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, *et al.* Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res.* 1990; 50(20):6502-7. 15.
41. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer Risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aerodigestive tract and liver. *Alcohol Res Health.* 2006; 29(3):193-8. 16.
42. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 2008; 87(1):14-32.
43. Review. Erratum *J Dent Res.* 2008; 87(2):191. 9.
44. Wünsch FV. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol.* 2002; 38: 737-746.
45. Hashibe M, Boffetta P, Zridze D, Shangina O, Dabrowska NS, Mates D *et al.* Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in central Europe. *Am J Epidemiol.* 2007; 165: 814-820.
46. Golas SM. Trends in palatine tonsillar cancer incidence and mortality rates in the United States. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007; 35: 98-108.

47. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997; 33(5):302-312.
48. Koh HK, Geller AC. Cancer prevention: preventing tobacco-related cancers. In: Devita-JR, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 7.ed. Lippincott Williams & Wilks, 2005.
49. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/fatores-de-risco-para-cancer-de-laringe-e-hipofaringe/7535/890/> - Acesso: 05 de Maio de 2015.
50. Abbas A, Delvinquiére K, Lechevrel M, Lebailey P, Gauduchon P, Launoy G et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a french population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004; 10 (23): 3389-3393.
51. Durazzo MD, Araújo CEN, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastase. *Clinics.* 2005; 60 (4): 293-298.
52. Neville BD, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* Ed. Guanabara Koogan S.A. 1998.
53. Ray A. Cancer preventive role of selected dietary factors. *Indian J Cancer.* 2005; 42 (1): 15-24.
54. Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C, La Vecchia C. The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatol.* 2009; 58(1-2):25-34.
55. Edefonti V, Hashibe M, Ambrogi F, Parpinel M, Bravi F, Talamini R, et al. Nutrient-based dietary patterns and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology consortium. *Ann Oncol.* 2012; 23(7):1869-80.
56. Deneo-Pellegrini H, Boffetta P, De Stefani E, Correa P, Ronco AL, Acosta G. Nutrient-based dietary patterns of head and neck cell cancer: a factor analysis in Uruguay. *Cancer Causes Control.* 2013; 24(6):1167-74.
57. Loria D, Barrios E, Zanetti R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Rev Panam Salud Publica.* 2009; 25(6):530-9.
58. Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(5): 1126-34.
59. Boffetta P, Couto E, Wichmann J, Ferrari P, Trichopoulos D, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(8): 529–537.
60. Kreimer AR, Randi G, Herrero R, Castellsague X, La Vecchia C, Franceschi S. IARC Multicenter oral cancer study group. Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: analysis from the IARC multinational case-control study. *Int J Cancer.* 2006; 118(9): 2293-2297.
61. Maserejian NN, Giovannucci E, Rosner B, Zavras A, Joshipura K. Prospective study of fruits and vegetables and risk of oral premalignant lesions in men. *Am J Epidemiol.* 2006; 164(6): 556-566.

62. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(6):449–455.
63. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2005; 14(2):467–475.
64. Neufcoeur PE, Arafa M, Delvenne P, Saussez S. Involvement of human papilloma virus in upper aero-digestive tracts cancer. *Bull Cancer.* 2009; 96(10):941-50.
65. Gillespie MB, Rubinchik S, Hoel B, Sutkowski N. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. *Curr Treat Options Oncol.* 2009; 10(5-6):296-307.
66. Curado MP, Boyle P. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Curr Opin Oncol.* 2013; 25(3):229-34.
67. Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12(6):431-41.
68. Luce D, Stücker I, ICARE Study Group. Investigation of occupational and environmental causes of respiratory cancers (ICARE): a multicenter, population-based case-control study in France. *BMC Public Health.* 2011; 11:928.
69. Gustavsson P, Jakobsson R, Johansson H, Lewin F, Norrel S, Rutkvist LE. Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx and oesophagus: a case-control in Sweden. *Occup Environ Med.* 1998; 55(6):393-400.
70. Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F. Meeting Report: Summary of IARC Monographs on Formaldehyde, 2-Butoxyethanol, and 1-tert-Butoxy-2-Propanol. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(9):1205-8.
71. Laforest L, Luce D, Goldberg P, Begin D, Gerin M, Demers PA, et al. Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. *Occup Environ Med.* 2000; 57(11):767-73.
72. Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabianova E, Fletcher T, et al. Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am J Epidemiol.* 2006; 164(4):367-375.
73. Dietz A, Ramroth H, Urban T, Ahrens W, Becher H. Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study. *Int J Cancer.* 2004; 108(6):907-11.
74. Elci OC, Akpınar-Elci M, Blair A, Dosemeci M. Occupational dust exposure and the risk of laryngeal cancer in Turkey. *Scand J Work Environ Health.* 2002; 28(4):278-84.
75. Elci OC, Akpınar-Elci M. Occupational exposures and laryngeal cancer among non-smoking and non-drinking men. *Int J Occup Environ Health.* 2009; 15(4):370-3.
76. Becher H, Flesh-Janys D, Kauppinen T, Kogevinas M, Steindorf K, Manz A. Cancer mortality in German ale workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Cause Control.* 1996; 7: 312-21.

77. Goldberg P, Leclerc A, Luce D, Morcet JF, Brugere J. Laryngeal and hypopharyngeal cancer and occupation: results of a case control-study. *Occup Environ Med.* 1997; 54(7):477-82.
78. Elci OC, Dosemeci M, Blair A. Occupation and the risk of laryngeal cancer in Turkey. *Scand J Work Environ Health.* 2001; 27(4):233-39.
79. Huebner WW, Schoenberg JB, Kelsey JL, Wilcox HB, McLaughlin JK, Greenberg RS, et al. Oral and pharyngeal cancer and occupation: a case control study. *Epidemiology.* 1992; 3(4):300-9.
80. Wortley P, Vaughan TL, Davis S, Morgan MS, Thomas DB. A case-control study of occupational risk factors for laryngeal cancer. *Br J Ind Med.* 1992; 49(12):837-44.
81. Merletti F, Boffetta P, Ferro G, Pisani P, Terracini B. Occupation and cancer of the oral cavity or oropharynx in Turin, Italy. *Scand J Work Environ Health.* 1991; 17(4):248-54.
82. Boffetta P, Richiardi L, Berrino F, Esteve J, Pisani P, Crosignani P, et al. Occupation and larynx and hypopharynx cancer: an international case control study in France, Italy, Spain, and Switzerland. *Canc Causes Contr.* 2003; 14(3):203-12.
83. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Oxford Journals – Carcinogenesis.* 2009; 30(6): 1003-1007.
84. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A et al. Germline missense mutations affecting KRAS isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 129-135.
85. O'Connell P, Leppert M, Hoff M, Kumlin E, Thomas W, Cai G et al. A linkage map for human chromosome 12. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37:169.
86. Lima CSP, Costa FF, Lourença GJ, Khater L, Chone CT, Crespo AN. Identificação de Genes de Susceptibilidade para o Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe. Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 2007.
87. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2007; 120: 2386–2392.
88. Vecchia CL, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology of Oral Cancer. *Oral Oncol.* 1997; 33 (5): 302-312.
89. Marsit CJ, Black CC, Posner MR, Kelsey KT. A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14:2371–2377.
90. Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17: 490–499.
91. Michalides R, Van Neeklan N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of 47 operable squamous cells carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 1995; 55: 975-978.
92. Rosas SI, Koch W, Carvalho MG. 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: 939-942.
93. Zariwala M, Schmid S, Pfaltz M, Ohgaki H, Kleihus P, Schafer R. P53 mutations in oropharyngeal carcinomas: a comparison of solitary and multiple primary tumours and lymph node metastasis. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1994; 78: 252-254.
 94. Ronchetti D, Weglia CB, Cesana BM, Carboni N, Neri A, Pruneri G, Pignataro L. Association between P53 gene mutations and tobacco and alcohol exposure in laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130(3): 303-306.
 95. Mathias C, Harreus V, Strange R. Influential factors on tumor recurrence in head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005; 263(1): 37-42.
 96. Curioni OA. Polimorfismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço: análise de risco e evolução clínica. [Tese – Doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.
 97. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M, Eckert GJ, Christen AG, Campbell SJr, Summerlin DJ, Reynolds N, Hartsfield JKJr. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93(4): 440-445.
 98. Shama CB, Perin NN, Rajani AB. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis.* 2002; 23(5): 803-807.
 99. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2004; 26(1): 63-70.
 100. Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, Bell D. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head Neck.* 2005 27(3): 232-242.
 101. Malgorzata R, Malgorzata W, Marzena G, Wiltol S, Krzystof S. The Impact of genetic factors on the incidence of multiple primary tumors (MPT) of head and neck. *Cancer Lett.* 2005; 224(2): 263-278.
 102. Unal M, Tamer L, Akbas Y, Pata YS, Vayisoglu Y, Degirmenci U, Camdeviren H. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase 2 in the susceptibility to laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2005; 27(12): 1056-1060.
 103. Tanimoto K, Yoshiga M, Ichikawa T. Polymorphism of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with cigarette dose. *Oral Oncol.* 1999; 35: 191-196.
 104. Kowalski M, Przybylowska K, Rusin P, Olszewski J, Morawiec-Sztandera A, Bielecka-Kowalska A et al. Genetic polymorphisms in DNA base excision repair gene XRCC1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28(1): 37.
 105. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 1207-1225.
 106. Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 795-803.

107. Lim SC. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacot.* 2009; 59:S366-S369.
108. Mohammadi M, Ollier WE, Hutchinson IV. A functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol.* 2003; 64: S125.
109. The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. da Costa Andrade VC, Parise O Jr, Hors CP, de Melo Martins PC, Silva AP, Garicochea B. *Exp Mol Pathol.* 2007 Feb;82(1):53-7. Epub 2006 Nov 3.
110. Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A. *Int J Cancer.* 2004 Aug 20;111(2):213-7.
111. Lopez GJS, Cristerna SJ, Vazquez MME, Jimenez OG, Aguilar CD. Localization and level of expression of B-catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otology-head and neck surgery.* 2004; 130(1): 89-93.
112. Wang L, Liu T, Wang Y, Cao L, Nishioka M, Aguiere RL et al. Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3 and B-catenin oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. *Virchows Archiv.* 2007; 451(5): 959-966.
113. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy D.R. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1982; 79: 4848-4852.
114. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
115. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature.* 1983;304: 501-506.
116. NCBI – National Center of Biotechnology Information. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=KRAS>
117. Chen AA, Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, McClean MD, Smith JF et al. Genetic variation in the vitamin C transporter, SLC23A2, modifies the risk of HPV16-associated head and neck cancer. *Oxford Journals – Carcinogenesis.* 2009; 30(6): 977-981.
118. Meyer MS, Applebaum KM, Furniss CS, Peters ES, Lockett BG, Smith JF et al. Human papillomavirus-16 modifies the association between fruit consumption and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17(12): 3419–3426.
119. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck.* 2006; 28(3):256-69.
120. Gorsky M, Littner MM, Sukman Y, Begleiter A. The prevalence of oral cancer in relation to the ethnic origin of Israeli Jews. The prevalence of oral cancer in relation to the ethnic origin of Israeli Jews. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(3):408-11.

121. Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC. A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2002; 38(2):216–7.
122. Romick-Rosendale LE, Lui VW, Grandis JR, Wells SI. The Fanconi anemia pathway: Repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma. *Mutat Res.* 2013; 743-744:78-88.
123. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-laringe-e-hipofaringe/2183/213/>
124. Dedivitis RA, Guimarães AV, Souza Jr. JAL. Manual de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Frôntis Editorial, São Paulo.1999;64.
125. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/biopsia-para-agnostico-do-cancer-de-laringe-e-hipofaringe/2184/213/> - Acesso: 05 de Maio de 2015.
126. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/exames-de-imagem-para-agnostico-do-cancer-de-laringe-e-hipofaringe/2185/213/> - Acesso: 05 de Maio de 2015.
127. Onakoya PA, Nwaorgu OG, Adenipekun AO, Aluko AA, Ibekwe TS. Quality of Life in Patients with Head and Neck Cancers. *J Natl Med Assoc.* 2006; 98(5): 765-70.
128. Costa LLA, Júnior FAR, Ramos CFC. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(2): 181-7.
129. Greene FL, Page D, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A, Fleming I. *AJCC Cancer Staging Manual 6th.* New York: Springer; 2002.
130. International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumors. Instituto Nacional do Câncer (INCA), 6.ed., Rio de Janeiro - RJ, 2004.
131. Ministério da Saúde. TNM Classificação de tumores malignos. Trad. 5a ed. UICC, 1997. Rio de Janeiro, 1998. 235p.
132. Lang K, Menzin J, Earle CC, Jacobson JMA, Hsu MA. The economic cost of squamous cell cancer of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130 (11): 1269-1275.
133. Yukako I, Nobukazu F, Minoru K, Takeshi K, Kazuhisa F, Hiroyuki T, et al. Treatment results of stage I oral tongue cancer with definitive radiotherapy. *Oral Oncol.* 2005; 41 (5): 520-525.
134. O'Sullivan EM. Oral and pharyngeal cancer in Ireland. *Ir Med J.* 2005; 98(4): 102-105.
135. Connor NP, Cohen SB, Kammer RE, Sullivan PA, Brewer KA, Hong TS, et al. Impact of conventional radiotherapy on health-related quality of life and critical functions of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 65(4):1051-62.
136. Braam MP, Roesink JM, Raaijmakers CP, Busschers WB, Terhaard CH. Quality of life and salivary output in patients with head-and-neck cancer five years after radiotherapy. *Radiat Oncol.* 2007;2:3.
137. Cardoso MFA, Novikoff S, Tresso A, Segreto RA, Cervantes O. Prevenção e controle das sequelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. *Radiol Bras.* 2005;38(2):107-15.
138. Alvarenga L de M, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologic evaluation of head and

- neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008;74(1):68-73.
139. Wan Leung S, Lee TF, Chien CY, Chao PJ, Tsai WL, Fang FM. Health-related quality of life in 640 head and neck cancer survivors after radiotherapy using EORTC QLQ-C30 and QLQ-H&N35 questionnaires. *BMC Cancer.* 2011;11:128.
140. Stoeckli SJ, Guidicelli M, Schneider A, Huber A, Schmid S. Quality of life after treatment for early laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001;258(2):96-9.
141. Gouveia Sobrinho EA, Carvalho MB, Franzi SA. Aspectos e tendências da avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Rev Soc Bras Cancerol.* 2001;4(15):10-8.
142. Knox JJ, Puodziunas AL, Feld R. Chemotherapy-induced oral mucositis.: Prevention and management. *Drugs Aging.* 2000;17(4):257-67.
143. Di Ciero L, Bellato CM, Ph.D. *Proteoma: Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 29 pg 158 a 164 ano 5, nov/dez 2002).*
144. Pandey, A.; Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, v. 405, p. 837-846, 2000.
145. Suresh S, Mohan SS, Mishra G, Hanumanthu GR, Suresh M, Reddy R, Pandey A. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. *Gene, Amsterdam*, v.364, p. 13-18, 2005
146. Kulasingam V, Diamandis EP. Tissue culture-based breast cancer biomarker discovery platform. *Int J Cancer.* 2008; 123(9): 2007-12.
147. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3): 210-9.
148. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(12): 952-8.
149. Liang S, Xu Y, Shen G, Liu Q, Zhao X, Xu Z et al. Quantitative protein expression profiling of 14-3-3 isoforms in human renal carcinoma shows 14-3-3 epsilon is involved in limitedly increasing renal cell proliferation. *Electrophoresis.* 2009; 30(23): 4152-62.
150. Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, Tanganelli P, Tarro G, Giordano A. Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev.* 2012.
151. Stroncek DF, Burns C, Martin BM, Rossi L, Marincola FM, Panelli MC. Advancing cancer biotherapy with proteomics. *J Immunother.* 2005; 28(3): 183-92.
152. Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Rep.* 2008; 41(9): 615-25.
153. Makawita S, Diamandis EP. The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches: current strategies for candidate verification. *Clin Chem.* 2010; 56(2): 212-22.
154. Liang S, Xu Z, Xu X, Zhao X, Huang C, Wei Y. Quantitative proteomics for cancer biomarker discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2012; 15(3): 221-31.

155. Qin XJ, Ling BX. Proteomic studies in breast cancer (Review). *Oncol Lett.* 2012; 3(4): 735-743.
156. Bertucci F, Goncalves A. Clinical proteomics and breast cancer: strategies for diagnostic and therapeutic biomarker discovery. *Future Oncol.* 2008; 4(2): 271-87.
157. Sparkman OD. Review of the 48th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics held in Long Beach, California. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2000; 11(10): 921.
158. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther.* 2002; 4(3): 242-50.
159. Alves P, Arnold RJ, Novotny MV, Radivojac P, Reilly JP, Tang H. Advancement in protein inference from shotgun proteomics using peptide detectability. *Pac Symp Biocomput.* 2007: 409-20.
160. Nesvizhskii AI. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol.* 2007; 367: 87-119.
161. Chen G, Luo Y, Wang X, Zhao Z, Liu H, Zhang H et al. A relatively simple and economical protocol for proteomic analyses of human 20S proteasome: Compatible with both scaled-up and scaled-down purifications. *Electrophoresis.* 2009; 30(14): 2422-30.
162. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009; 11: 49-79.
163. Chaerkady R, Pandey A. Quantitative proteomics for identification of cancer biomarkers. *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1(9): 1080-9.
164. Martinkova J, Gadher SJ, Hajduch M, Kovarova H. Challenges in cancer research and multifaceted approaches for cancer biomarker quest. *FEBS Lett.* 2009; 583(11): 1772-84.
165. Spellman DS, Deinhardt K, Darie CC, Chao MV, Neubert TA. Stable isotopic labeling by amino acids in cultured primary neurons: application to brain-derived neurotrophic factor-dependent phosphotyrosine-associated signaling. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(6): 1067-76.
166. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 840518.
167. Veenstra TD. Global and targeted quantitative proteomics for biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 847(1): 3-11.
168. Li M, Lin YM, Hasegawa S, Shimokawa T, Murata K, Kameyama M et al. Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol.* 2004; 24(2): 305-12.
169. Johann DJ, Rodriguez-Canales J, Mukherjee S, Prieto DA, Hanson JC, Emmert-Buck M et al. Approaching solid tumor heterogeneity on a cellular basis by tissue proteomics using laser capture microdissection and biological mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2009; 8(5): 2310-8.
170. Chang KP, Yu JS, Chien KY, Lee CW, Liang Y, Liao CT et al. Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology. *J Proteome Res.* 2011; 10(11): 4935-47.
171. Chang KP, Yu JS, Chien KY, Lee CW, Liang Y, Liao CT et al. Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in

- oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology. *J Proteome Res.* 2011; 10(11): 4935-47.
172. Xiao T, Ying W, Li L, Hu Z, Ma Y, Jiao L et al. An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood. *Mol Cell Proteomics.* 2005; 4(10): 1480-6.
173. Bence-Jones H. *Papers on Chemical Pathology. Lecture III.* *Lancet.* 1847; 269-72.
174. Polanski M, Anderson NL. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomark Insights.* 2007; 1: 1-48.
175. Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(21): 7677-82.
176. Li YP, Hu CP, Yang HZ. Clinical value of tumor supplied group of factor combined with CEA in diagnosing tuberculosis pleural effusion and malignant pleural effusion. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003; 28(6): 608-10.
177. Yamamoto M, Baba H, Kakeji Y, Endo K, Ikeda Y, Toh Y et al. Prognostic significance of tumor markers in peritoneal lavage in advanced gastric cancer. *Oncology.* 2004; 67(1): 19-26.
178. Cook GB, Neaman IE, Goldblatt JL, Cambetas DR, Hussain M, Lüftner D et al. Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer. *Anticancer Res.* 2001; 21(2B): 1465-70.
179. Mian C, Lodde M, Haitel A, Egarter Vigl E, Marberger M, Pycha A. Comparison of two qualitative assays, the UBC rapid test and the BTA stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2000; 56(2): 228-31.
180. Lima N, Cavaliere H, Tomimori E, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prognostic value of serial serum thyroglobulin determinations after total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25(2): 110-5.
181. De Masi S, Tosti ME, Mele A. Screening for hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 2005; 37(4): 260-8.
182. Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA.* 1995; 273(4): 289-94.
183. Dabrowska M, Grubek-Jaworska H, Domagała-Kulawik J, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Krenke R et al. Diagnostic usefulness of selected tumor markers (CA125, CEA, CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with non-small cell lung cancer. *Pol Arch Med Wewn.* 2004; 111(6): 659-65.
184. Yamaguchi K, Nagano M, Torada N, Hamasaki N, Kawakita M, Tanaka M. Urine diacetylspermine as a novel tumor marker for pancreaticobiliary carcinomas. *Rinsho Byori.* 2004; 52(4): 336-9.
185. Ciambellotti E, Coda C, Lanza E. Determination of CA 15-3 in the control of primary and metastatic breast carcinoma]. *Minerva Med.* 1993; 84(3): 107-12
186. Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2006; 18(3): 228-33.

187. Deshpande AM, Wong DT. Molecular mechanisms of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008; 8(5): 799-809.
188. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5): 324-34.
189. Kövesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(5):274-7.
190. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002;9(5):369-78.
191. Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg.* 2004;57(7):595-602.
192. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M et al. Cyclin D1 amplification and p16 (MTS1/CDK41) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope.* 2002;112(3):472-81.
193. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(9):502-8.
194. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2005;86(6):347-63
195. Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Nakaya H, Hase T et al. Predictive value of measuring p53 labeling index at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14(1): 57-61.
196. Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res.* 2011; 25(1): 34-41.
197. Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53(1): 89-93.
198. Canevari RA, Rogatto SR. Câncer de cabeça e pescoço. In: Ferreira CG, Casalli JCR, organizadores. *Oncologia molecular.* 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004; 189-203.
199. Awada A, Lalami Y. Molecular markers, molecular-targeted therapies and taxanes: how to integrate the progress into clinical research and practice for the management of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.* 2005;17(3):209-11.
200. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(1):3-9.
201. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(4):689-708.
202. Ruiz T, Bertelli EP, Maniglia JV, Ruback MJC. Head and neck cancer epidemiology and biomarkers. *Arq Ciênc Saúde.* 2006; 13(1):34-8.
203. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/novidades/2181/134/> acessado em 20/05/2015
204. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol.* 1998;51(10):771-5.

205. Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2000;6(7):2821-8.
206. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression. (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2001;21(1B):689-95.
207. Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Craniomaxillofac Surg*. 2004; 32(3):176-81.
208. Werner JA, Rathcke IO, Mandic R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(4):275-82).
209. Canevari RA, Rogatto SR. Câncer de cabeça e pescoço. In: Ferreira CG, Casalli JCR, organizadores. *Oncologia molecular*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004; 189-203.
210. Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2001;95(1):44-50.
211. Moilanen M, Pirila E, Grenman R, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol*. 2002;197(1):72-81.
212. Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2002;95(9):1902-10.
213. Shibakita M, Tachibana M, Dhar DK, Kotoh T, Kinugasa S, Kubota H et al. Prognostic significance of Fas and Fas ligand expressions in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(9):2464-9.
214. Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P, Lin D. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(13):1030-6.
215. Bel Hadj Jrad B, Mahfouth W, Bouaouina N, Gabbouj S, Ahmed SB, Ltaïfef M et al. A polymorphism in FAS gene promoter associated with increased risk of nasopharyngeal carcinoma and correlated with antinuclear autoantibodies induction. *Cancer Lett*. 2006;233(1):21-7.
216. Do NY, Lim SC. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep*. 2004 Aug;12(2):229-37.
217. Parise Junior O, Carvalho LV, Miguel RE, Kowalski LP. Prognostic impact of p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma. *Sao Paulo Med J*. 2004 Nov 4;122(6):264-8. Epub 2005 Feb 2.
218. Le QT, Giaccia AJ. Therapeutic exploitation of the physiological and molecular genetic alterations in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4287-95.
219. Estecio MR, Youssef EM, Rahal P, Fukuyama EE, Góis-Filho JF, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM, Issa JP, Tajara EH. LHX6 is a sensitive

- methylation marker in head and neck carcinomas. *Oncogene*. 2006;25(36):5018-26.
220. Gronau S, Koeni-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;128(5):674-80.
221. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(4):440-5.
222. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001;37(7):593-8.
223. Drummond SN, Gomez RS, Motta Noronha JC, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol*. 2005;41(5):515-9.
224. Rossit ARB, Conforti-Froes NDT. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev Soc Bras Cancerol*. 2000;10:22-30.
225. Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004;101(1):125-32.
226. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M et al. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphism in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett*. 2002;187(1-2):95-101.
227. Li R, Folsom AR, Sharrett AR, Couper D, Bray M, Tyroler HA. Interaction of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on risk of lower extremity arterial disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2001; 154(3):729-38.
228. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LCL, Maniglia JV, Rossit ARB, Ruiz MT. et al., Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Rev Assoc Med Bras* (in press), 2006.
229. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS*. 2011; 15(6): 353-61.
230. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(1): 51-61.
231. Saawarn S, Astekar M, Saawarn N, Dhakar N, Gomateshwar Sagari S. Cyclin d1 expression and its correlation with histopathological differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Scientific World Journal*. 2012; 2012: 978327.
232. Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53(1): 89-93.
233. Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol*. 2006; 19(10): 1310-6.

234. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2003; 442(1): 1-7.
235. Nilsson K, Svensson S, Landberg G. Retinoblastoma protein function and p16INK4a expression in actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin and links between p16INK4a expression and infiltrative behavior. *Mod Pathol.* 2004; 17(12): 1464-74.
236. Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2008; 44(7): 689-97.
237. Zhou J, Xu B, Huang J, Jia X, Xue J, Shi X et al. 1H NMR-based metabonomic and pattern recognition analysis for detection of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2009; 401(1-2): 8-13.
238. Henriksson E, Baldetorp B, Borg A, Kjellen E, Akervall J, Wennerberg J et al. p53 mutation and cyclin D1 amplification correlate with cisplatin sensitivity in xenografted human squamous cell carcinomas from head and neck. *Acta Oncol.* 2006; 45(3): 300-5.
239. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62(24):7350-6.
240. Li ZB, Lehar M, Braga N, Westra W, Liu LH, et al. Study of human laryngeal muscle protein using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2003; 3: 1325–1334.
241. Ralhan R, Desouza LV, Matta A, Chandra Tripathi S, Ghanny S, et al. (2008) Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7: 1162–1173.
242. Li ZB, Lehar M, Braga N, Westra W, Liu LH, Flint PW. Study of human laryngeal muscle protein using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Flint1 Proteomics* 2003; 3:1325–1334.
243. Zhang X, Xiao Z, Chen Z, Li C, Li J, Yanhui Y, Yang F, Yang Y, Oyang Y. Comparative proteomics analysis of the proteins associated with laryngeal carcinoma-related gene 1. *Laryngoscope.* 2006; 116(2):224-30.
244. Zhou JR, Fu ZX, Wei LZ, Li P, Li JC. Identification of tumor-associated proteins in laryngeal squamous cell carcinoma by proteomics. 2007;42(12):934-8.
245. Sewell DA, Yuan CX, Robertson E. Proteomic signatures in laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J OtorhinolaryngolRelat Spec.*2007;69(2):77-84.
246. Holgersson G, Ekman S, Reizenstein J, Bergqvist M, Pontén F, Uhlén M, Magnusson K, Jonnalagadda P, Asplund A, Strömberg S, Linder A, Blomquist E, Liljeholm M, Löden B, Hellström K, Bergström S. Molecular profiling using tissue microarrays as a tool to identify predictive biomarkers in laryngeal cancer treated with radiotherapy. *CancerGenomicsProteomics.* 2010; 7(1):1-7.
247. Zhang H, Song X, Liu X, Zhang Q, Sun Y, Chen X, Liu C, Wang Y. Preliminary proteomic analysis of human serum from patients with laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012;269(2):557-63.

248. Kim JS, Chang JW, Park JK, Hwang SG. Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating. *Cancer Biology & Therapy*. 2012; 13:8, 638-646.
249. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. Screening and mass spectrometry analysis of differentially expressed proteins of plasm between laryngocarcinoma and healthy individuals. 2013;27(14):771-4.
250. Li L, Zhang Z, Wang C, Miao L, Zhang J, Wang J, Jiao B, Zhao S. Quantitative Proteomics Approach to Screening of Potential Diagnostic and Therapeutic Targets for Laryngeal Carcinoma. *PLOS ONE* - www.plosone.org February 2014; 9(2): e90181.
251. Chambers MC, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, Gatto L, Fischer B, Pratt B, Egertson J, Hoff K, Kessner D, Tasman N, Shulman N, Frewen B, Baker TA, Brusniak MY, Paulse C, Creasy D, Flashner L, Kani K, Moulding C, Seymour SL, Nuwaysir LM, Lefebvre B, Kuhlmann F, Roark J, Rainer P, Detlev S, Hemenway T, Huhmer A, Langridge J, Connolly B, Chadick T, Holly K, Eckels J, Deutsch EW, Moritz RL, Katz JE, Agus DB, MacCoss M, Tabb DL, Mallick P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*. 2012; 30: 918–920 - doi:10.1038/nbt.2377
252. Martens L, Chambers M, Sturm M, Kessner D, Levander F, Shofstahl J, Tang WH, Rompp A, Neumann S, Pizarro AD, et al. mzML—a community standard for mass spectrometry data. *Mol. Cell Proteomics*. 2011;10:R110 000133.
253. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
254. Gatto L and Lilley KS. MSnbase - an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. *Bioinformatics*. 2012; 28:288-289.
255. Griffin NM, Yu J, Long F, Oh P, Shore S, Li Y, Koziol JA, Schnitzer JE. Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nat Biotechnol*. 2010 Jan;28(1):83-9. doi: 10.1038/nbt.1592. PMID: 20010810; PubMed Central PMCID: PMC2805705
256. <http://www.uniprot.org/uniprot/P19971>. Acesso: Julho/2015
257. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=3628>. Acesso: Julho/2015
258. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/TYMPID40397ch22q13.html>. Acesso: Julho/2015
259. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TYMP>. Acesso: Julho/2015
260. Jimeno A, Rodríguez-Pinilla M, Rodríguez-Peralto JL, Millán JM, López-Martín A, Brandariz A, Peña C, Cortés-Funes H. Phase II trial of cisplatin and capecitabine in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, and correlative study of angiogenic factors. *Br J Cancer*. 2004 Dec 13;91(12):2005-11.
261. Liu Y¹, Xue X, Wang F. The expressions of TP, MK and CD105 in laryngeal squamous cell carcinoma and their clinical significance. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008 Feb;22(3):100-3.

262. Saito K, Khan K, Yu SZ, Ronson S, Rhee J, Li G, Van Echo D, Suntharalingam M, O'Malley BW Jr, Li D. The predictive and therapeutic value of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in capecitabine (Xeloda)-based chemotherapy for head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2009 Jan;119(1):82-8. doi: 10.1002/lary.20003.
263. <http://www.uniprot.org/uniprot/P24821>. Acesso: Julho/2015
264. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/TNCID42597ch9q33.html>. Acesso: Julho/2015
265. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNC>
Acesso: Julho/2015
266. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=4894>
Acesso: Julho/2015
267. Yoshida T, Yoshimura E, Numata H, Sakakura Y, Sakakura T. Involvement of tenascin-C in proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells. *Virchows Arch*. 1999 Nov;435(5):496-500.
268. Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Adány R. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Laryngoscope*. 2000 Jan;110(1):84-92.
269. Goussia AC, Ioachim EE, Peschos D, Assimakopoulos DA, Skevas A, Agnantis NJ. Expression of the extracellular matrix protein tenascin in laryngeal epithelial lesions: correlation with fibronectin, CD44, cathepsin D and proliferation indices. *Virchows Arch*. 2000 Jun;436(6):579-84
270. Zhang S, Liu Q, Liu Z, Hua X. Expression of extracellular matrix glycoprotein tenascin in the laryngeal cancer. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2002 Dec;16(12):643-5.
271. Charalabopoulos K, Mittari E, Karakosta A, Golias C, Batistatou A. Integrins adhesion molecules and some of their ligands in laryngeal cancer. *Exp Oncol*. 2005 Jun;27(2):86-90.
272. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_RPLP1.html.
Acesso: Julho/2015
273. <http://www.uniprot.org/uniprot/P05386>. Acesso: Julho/2015
274. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=22929>.
Acesso: Julho/2015
275. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPLP1>
Acesso: Julho/2015
276. Caputo E, Maiorana L, Vasta V, Pezzino FM, Sunkara S, Wynne K, Elia G, Marincola FM, McCubrey JA, Libra M, Travali S, Kane M. Characterization of human melanoma cell lines and melanocytes by proteome analysis *Cell Cycle*. 2011 Sep 1;10(17):2924-36. Epub 2011 Sep 1.
277. Chen A, Kaganovsky E, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Okon E, Koch Y. Two forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) are expressed in human breast tissue and overexpressed in breast cancer: a putative mechanism for the antiproliferative effect of GnRH by down-regulation of acidic ribosomal phosphoproteins P1 and P2. *Cancer Res*. 2002 Feb 15;62(4):1036-44.
278. Artero-Castro A, Castellvi J, García A, Hernández J, Ramón y Cajal S, Leonart ME. Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Hum Pathol*. 2011 Feb;42(2):194-203. doi: 10.1016/j.humpath.2010.04.020. Epub 2010 Oct 30.

279. Artero-Castro A, Kondoh H, Fernández-Marcos PJ, Serrano M, Ramón y Cajal S, Leonart ME. Rplp1 bypasses replicative senescence and contributes to transformation. *Exp Cell Res*. 2009 May 1;315(8):1372-83. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.02.007. Epub 2009 Feb 20.
280. <http://www.uniprot.org/uniprot/P05164>. Acesso: Julho/2015
281. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_MPO.html Acesso: Julho/2015
282. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MPO>. Acesso: Julho/2015
283. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92888>. Acesso: Julho/2015
284. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_ARHGEF1.html. Acesso: Julho/2015
285. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=10561>. Acesso: Julho/2015
286. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARHGEF1> Acesso: Julho/2015
287. <http://www.uniprot.org/uniprot/P47897>. Acesso: Julho/2015
288. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_QARS.html. Acesso: Julho/2015
289. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=6785>. Acesso: Julho/2015
290. <http://www.uniprot.org/uniprot/P01008>. Acesso: Julho/2015
291. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=31>. Acesso: Julho/2015
292. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_SERPINC1.html. Acesso: Julho/2015
293. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPINC1>. Acesso: Julho/2015
294. Sharma S, Ray S, Moiyadi A, Sridhar E, Srivastava S. Quantitative proteomic analysis of meningiomas for the identification of surrogate protein markers. *Sci Rep*. 2014 Nov 21;4:7140. doi: 10.1038/srep07140.
295. Fidan E, Kavgaci H, Orem A, Yilmaz M, Yildiz B, Fidan S, Akcan B, Ozdemir F, Aydin F. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and thrombin-antithrombin-III-complex levels in patients with gastric cancer. *Tumour Biol*. 2012 Oct;33(5):1519-25. doi: 10.1007/s13277-012-0403-6. Epub 2012 Apr 27.
296. Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, Ohdan H. Ann Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Surg Oncol*. 2012 Sep;19(9):2888-96. doi: 10.1245/s10434-012-2338-y. Epub 2012 Mar 31.
297. <http://www.uniprot.org/uniprot/P25705>. Acesso: Julho/2015
298. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_ATP5A1.html. Acesso: Julho/2015
299. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=1017>. Acesso: Julho/2015
300. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATP5A1>. Acesso: Julho/2015
301. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q09666>. Acesso: Julho/2015

302. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_AHNAK.html. Acesso: Julho/2015
303. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=1533>. Acesso: julho/2015
304. Dumitru CA, Bankfalvi A, Gu X, Zeidler R, Brandau S, Lang S. AHNAK and inflammatory markers predict poor survival in laryngeal carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e56420. doi: 10.1371/journal.pone.0056420. Epub 2013 Feb 7.
305. Weller P, Bankfalvi A, Gu X, Dominas N, Lehnerdt GF, Zeidler R, Lang S, Brandau S, Dumitru CA. The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2014 May;50(7):1291-300. doi: 10.1016/j.ejca.2014.02.016. Epub 2014 Mar 11.
306. <http://www.uniprot.org/uniprot/P31949>. Acesso: Julho/2015
307. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_S100A11.html. Acesso: Julho/2015
308. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=2079>. Acesso: Julho/2015
309. Wang C, Zhang Z, Li L, Zhang J, Wang J, Fan J, Jiao B, Zhao S. S100A11 is a migration-related protein in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci*. 2013 Sep ;10(11):1552-9. doi: 10.7150/ijms.5986. eCollection 2013
310. <http://www.uniprot.org/uniprot/P30304>. Acesso: Julho/2015
311. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/CDC25AID40004ch3p21.html>. Acesso: Julho/2015
312. Bonin S, Brunetti D, Benedetti E, Gorji N, Stanta G. Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and post-menopausal breast cancer *Virchows Arch*. 2006 May;448(5):539-44. Epub 2006 Jan 27.
313. Huang MY, Wang JY, Chang HJ, Kuo CW, Tok TS, Lin SR. CDC25A, VAV1, TP73, BRCA1 and ZAP70 gene overexpression correlates with radiation response in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2011 May;25(5):1297-306. doi: 10.3892/or.2011.1193. Epub 2011 Feb 22.
314. Fraczek M, Woźniak Z, Ramsey D, Zatoński T, Nadolska B, Krecicki T. Prognostic value of CDC25 phosphatases expression in laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol*. 2007;61(5):668-74. doi: 10.1016/S0030-6657(07)70504-8.
315. Fraczek M¹, Wozniak Z, Ramsey D, Krecicki T. Expression patterns of cyclin E, cyclin A and CDC25 phosphatases in laryngeal carcinogenesis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007 Aug;264(8):923-8. Epub 2007 Mar 15.
316. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q86UE4>. Acesso: Julho/2015
317. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_MTDH.html. Acesso: Julho/2015
318. Liu Y, Su Z, Li G, Yu C, Ren S, Huang D, Fan S, Tian Y, Zhang X, Qiu Y. Increased expression of metadherin protein predicts worse disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2013 Aug 1;133(3):671-9. doi: 10.1002/ijc.28071. Epub 2013 Mar 7.
319. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q75QN2>. Acesso: Julho/2015

320. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_INTS8.html. Acesso: Julho/2015
321. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INTS8>. Acesso: Julho/2015
322. Cheng L, Zhang Q, Yang S, Yang Y, Zhang W, Gao H, Deng X, Zhang Q. A 4-gene panel as a marker at chromosome 8q in Asian gastric cancer patients. *Genomics*. 2013 Oct;102(4):323-30. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.05.004. Epub 2013 May 28.
323. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y2X3> Acesso: Julho/2015
324. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_NOP58.html. Acesso: Julho/2015
325. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOP58>. Acesso: Julho/2015
326. Renieri A, Mencarelli MA, Cetta F, Baldassarri M, Mari F, Furini S, Piu P, Ariani F, Dragani TA, Frullanti E. Oligogenic germline mutations identified in early non-smokers lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*. 2014 Aug;85(2):168-74. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.05.020. Epub 2014 Jun 4.
327. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H6E5>. Acesso: Julho/2015
328. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_TUT1.htm Acesso: Julho/2015
329. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TUT1>. Acesso: Julho/2015
330. Zhu DQ¹, Lou YF, He ZG, Ji M. Nucleotidyl transferase TUT1 inhibits lipogenesis in osteosarcoma cells through regulation of microRNA-24 and microRNA-29a. *Tumour Biol*. 2014 Dec;35(12):11829-35. doi: 10.1007/s13277-014-2395-x. Epub 2014 Aug 21.
331. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N720>. Acesso: Julho/2015
332. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_ZNF655.html Acesso: Julho/2015
333. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF655> Acesso: Julho/2015
334. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7KZF4> Acesso: Julho/2015
335. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_SND1.html Acesso: Julho/2015
336. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SND1> Acesso: Julho/2015
337. Yin J, Ding J, Huang L, Tian X, Shi X, Zhi L, Song J, Zhang Y, Gao X, Yao Z, Jing X, Yang J. SND1 affects proliferation of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 by regulating IGFBP3 expression. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013 Oct;296(10):1568-75. doi: 10.1002/ar.22737. Epub 2013 Jul 22.
338. Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J, Gredler R, Akiel MA, Robertson CL, Emdad L, Fisher PB, Sarkar D. Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (review). *Int J Oncol*. 2015 Feb;46(2):465-73. doi: 10.3892/ijo.2014.2766. Epub 2014 Nov 18.
339. Kuruma H, Kamata Y, Takahashi H, Igarashi K, Kimura T, Miki K, Miki J, Sasaki H, Hayashi N, Egawa S. Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 as a potential tissue marker for prostate cancer. *Am*

- J Pathol. 2009 Jun;174(6):2044-50. doi: 10.2353/ajpath.2009.080776. Epub 2009 May 12.
340. Blanco MA, Alečković M, Hua Y, Li T, Wei Y, Xu Z, Cristea IM, Kang Y. Identification of staphylococcal nuclease domain-containing 1 (SND1) as a Metadherin-interacting protein with metastasis-promoting functions. J Biol Chem. 2011 Jun 3;286(22):19982-92. doi: 10.1074/jbc.M111.240077. Epub 2011 Apr 8.
341. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IYD9>. Acesso: Julho/2015
342. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_C18orf54.html. Acesso: Julho/2015
343. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C18orf54>. Acesso: Julho/2015
344. Liu PY¹, Vikis H, James M, Lu Y, Wang DL, Liu HB, Wen WD, Wang Y, You M. Identification of Las2, a major modifier gene affecting the Pas1 mouse lung tumor susceptibility locus. Cancer Res. 2009 Aug 1;69(15):6290-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0782. Epub 2009 Jul 21.
345. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ECI4>. Acesso: Julho/2015
346. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_ZNF470.html Acesso: Julho/2015
347. <http://www.uniprot.org/uniprot/O60832> Acesso: Julho/2015
348. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/DKC1ID157.html> Acesso: Julho/2015
349. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=6750> Acesso: Julho/2015
350. Sieron P, Hader C, Hatina J, Engers R, Wlazlinski A, Müller M, Schulz WA. DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression. Br J Cancer. 2009 Oct 20;101(8):1410-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6605299. Epub 2009 Sep 15.
351. Alawi F, Lee MN. DKC1 is a direct and conserved transcriptional target of c-MYC. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Nov 3;362(4):893-8. Epub 2007 Aug 24.
352. <http://www.uniprot.org/uniprot/P13804> Acesso: Julho/2015
353. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_ETFA.html Acesso: Julho/2015
354. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=695> Acesso: Julho/2015
355. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6IQ22> - Acesso: Julho/2015
356. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_RAB12.html Acesso: Julho/2015
357. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAB12> Acesso: Julho/2015
358. Yoshida T, Kobayashi T, Itoda M, Muto T, Miyaguchi K, Mogushi K, Shoji S, Shimokawa K, Iida S, Uetake H, Ishikawa T, Sugihara K, Mizushima H, Tanaka H. Clinical omics analysis of colorectal cancer incorporating copy number aberrations and gene expression data. Cancer Inform. 2010 Jul 29;9:147-61.
359. <http://www.uniprot.org/uniprot/P55072> Acesso: Julho/2015
360. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/VCPID42786ch9p13.html> Acesso: Julho/2015

361. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VCP> Acesso: Julho/2015
362. <http://www.uniprot.org/uniprot/A8MPX8> Acesso: Julho/2015
363. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_PP2D1.html Acesso: Julho/2015
364. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PP2D1> Acesso: Julho/2015
365. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6NX49> - Acesso: Julho/2015
366. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_ZNF544.html Acesso: Julho/2015
367. <http://www.uniprot.org/uniprot/P49591> - Acesso: Julho/2015
368. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_SARS.html Acesso: Julho/2015
369. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=6972> Acesso: Julho/2015
370. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6PP77> Acesso: Julho/2015
371. http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_XKRX.html Acesso: Julho/2015
372. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=XKRX> Acesso: Julho/2015

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1: Estágio do Sistema TNM

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região supraglótica da laringe para a categoria T

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da supraglote com mobilidade normal da corda vocal
T2	Tumor invadindo a mucosa de mais de uma sub-localização anatômica adjacente da supraglote ou glote ou região externa à supraglote (por ex: mucosa da base da língua, a valécula, a parede medial do seio piriforme) sem fixação da laringe
T3	Tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal e/ou invadindo qualquer uma das seguintes estruturas: área pós-cricoide, tecidos pré epiglóticos, espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide(ex:córtex interna)
T4a	Tumor invadindo toda a cartilagem tireóide e/ou estendendo-se aos tecidos além da laringe(por ex: traquéia, partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular, tireóide e esôfago)
T4b	Tumor invadindo espaço pré-vertebral ou estruturas mediastinais ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região supraglótica da laringe para a categoria N

Categoria N	Linfonodos regionais
N_x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N₀	Linfonodos sem metástases
N₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região supraglótica da laringe para a categoria M

Categoria M	Metástase á distância
Mx	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região glótica da laringe para a categoria T

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T₀	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T₁	Tumor limitado à corda(s) vocal(ais) (pode envolver a comissura anterior ou posterior) com mobilidade normal da(s) corda(s)
T1a	Tumor limitado a uma corda vocal
T1b	Tumor envolve ambas as cordas vocais
T2	Tumor que se estende à supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal e/ou que invade o espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide(ex:córtex interna)
T4a	Tumor que invade completamente a cartilagem tireóide e/ou se estende aos tecidos além da laringe(ex:traquéia, tecidos moles do pescoço, etc)
T4b	Tumor invade espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para a categoria N do câncer da região glótica da laringe

Categoria N	Linfonodos regionais
N_x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N₀	Linfonodos sem metástases
N₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N_{2a}	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N_{2b}	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N_{2c}	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N₃	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para a categoria M do câncer da região glótica da laringe

Categoria M	Metástase á distância
Mx	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para a categoria T do câncer da região subglótica da laringe

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T₀	Nenhuma evidência de tumor primário
T_{is}	Carcinoma <i>in situ</i>
T₁	Tumor limitado à subglote
T₂	Tumor que se estende à corda(s) vocal(ais) com mobilidade normal ou reduzida da mesma
T₃	Tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal
T_{4a}	Tumor que invade a cartilagem tireóide ou cricóide e/ou se estende a outros tecidos além da laringe(ex:traquéia, tecidos moles do pescoço,etc)
T_{4b}	Tumor invade espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para a categoria N do câncer da região subglótica da laringe

Categoria N	Linfonodos regionais
N_x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N₀	Linfonodos sem metástases
N₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para a categoria M do câncer da região subglótica da laringe

Categoria M	Metástase à distância
Mx	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Grupos de estadiamento e características TNM do câncer de cabeça e pescoço, da laringe.

Estádio	Código
Estádio 0	Tis, N0, M0
Estádio I	T1, N0, M0
Estádio II	T2, N0, M0
Estádio III	T1, N1, M0
	T2, N1, M0
	T3, N0, M0
	T3, N1, M0
Estádio IVA	T1, N2, M0
	T2, N2, M0
	T3, N2, M0
	T4a, N0, M0
	T4a, N1, M0
	T4a, N2, M0
Estádio IVB	Qualquer T, N3, M0
	T4b, Qualquer N, M0
Estádio IVC	Qualquer T, Qualquer N, M1

8.2 Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 01/11/12
(Grupo II)

2ª VIA

PARECER CEP: Nº 873/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0646.1.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "GENÉTICA E PROTEÔMICA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carmen Sílvia Passos Lima

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/11/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/11/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Realizar um estudo genômico e proteômico em pacientes com carcinoma de células escamosas (CEC) de orofaringe.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo prospectivo multicêntrico, nacional, aberto, com a participação da FCM-Unicamp, da Universidade de Cuiabá (MT) e do Hospital Geral de Bonsucesso (RJ). O estudo está dividido em três sub-projetos:

SUB-PROJETO 1: Pesquisadores: Gustavo J. Lourenço, Carlos T. Chone, Leticia Khater e Agrício N. Crespo "IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE POR GENOTIPAGEM EM LARGA ESCALA", cujo objetivo principal é avaliar os papéis de cerca de uma centena de polimorfismos gênicos no CEC de orofaringe em indivíduos do nosso meio. Para cumprir tais objetivos, serão avaliados 100 pacientes com CEC de orofaringe e 100 controles (sem CEC) atendidos no Hemocentro. Os dados clínicos e anátomo-patológicos serão obtidos de interrogatórios específicos e prontuários médicos dos pacientes. A genotipagem em larga escala será realizada por meio de micro-arranjos (microarrays) de DNA da plataforma da empresa Affymetrix, que possibilitará a identificação de 116.204 SNPs.

SUB-PROJETO 2: Pesquisadoras: Carmen Sílvia Bertuzzo e Marília Bueno Santiago "ANÁLISE DE PROTEOMA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE", cujos objetivos são: estudar as células tumorais e células normais em seu contexto proteômico em pacientes portadores de CEC de orofaringe e realizar estudos com a proteína em solução, por meio de métodos espectroscópicos, de forma a caracterizá-la. O material será obtido dos mesmos pacientes anteriores, e as proteínas serão extraídas de 100 espécimes cirúrgicos.

SUBPROJETO 3: Pesquisadores: Maria E. Pizzigatti Correa, Marcelo Addas de Carvalho, Vanessa R. L. Shcaira e Jacks J. Junior "POLIMORFISMO DOS GENES CODIFICADORES DA IL-1, IL-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL NA OCORRÊNCIA

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6131
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



E GRAVIDADE DA MUCOSITE ORAL EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA”, cujos objetivos são: avaliar a frequência e a intensidade da mucosite nos pacientes do estudo; quantificar as interleucinas IL-1, IL-6 e o TNF-alfa na saliva dos pacientes antes, durante e após o tratamento; identificar os genótipos dos polimorfismos dos genes codificadores da IL-1, IL-6 e TNF-alfa em pacientes do estudo; e verificar se as concentrações das citocinas e genótipos dos polimorfismos diversos alteram a ocorrência e gravidade da mucosite. Serão avaliados 100 pacientes portadores de CEC da cavidade oral, submetidos a tratamento com radioterapia (7.000cG em seis semanas) e quimioterapia (cisplatina) protocolar nos serviços. Cem doadores de sangue, pareados aos pacientes por idade, sexo e raça servirão como controles do estudo para identificação das frequências dos genótipos distintos na população geral.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

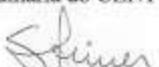
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2007.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.3 Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: “Genética e Proteômica do Carcinoma de Células Escamosas de Laringe”

Paciente:.....

Idade:anos **Sexo:** **Raça:**

RG: **HC:**

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente incapacitado):

RG:..... **Grau de parentesco:**

Endereço:.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue a ser colhida em veia de um dos braços e um pedaço do material que está sendo retirado para análise e uma amostra de tecido colhida em cirurgia. Estou ciente de que estas amostras serão utilizadas para estudo e neoplasias de cabeça e pescoço. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sentir dor de pequena intensidade e curta duração no local de punção da veia. Sei que terei direito de saber o resultado do meu exame e que receberei todas as explicações sobre o que for encontrado. Sei que poderei não ter benefícios. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento nessa Instituição. Sei que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Estou ainda ciente, que nenhum outro estudo usando o mesmo material será realizado sem a

aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, no ambulatório de Oncogenética do Hospital das Clínicas da UNICAMP, telefone: (19) 3521 7496 ou 3521 7363. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM/ UNICAMP, telefone:(19) 3521 8936 ou 3521 7187. Tenho a opção de querer ou não que o meu material biológico seja armazenado. Qualquer estudo que venha a ser feito com o material armazenado, primeiro deverá ser aprovado pelo CEP/FCM/UNICAMP.

- aceito o armazenamento
- quero que entrem em contato comigo caso meu material seja utilizado em outra pesquisa
- não quero que entrem em contato comigo caso meu material seja utilizado em outra pesquisa
- não aceito o armazenamento

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do responsável legal

.....

Assinatura do pesquisador legal

Campinas, / /