



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise do padrão de metilação do carcinoma pavimento-celular da cavidade oral

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Carreira e da Professora Doutora Carmen Alpoim (Universidade de Coimbra)

Ana Beatriz Cainço Domingues

2013

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Isabel Carreira, dedico um profundo agradecimento pela orientação neste projecto, pelos ensinamentos e apoio prestados, pela oportunidade que me disponibilizou para realizar este projeto

À Professora Doutora Carmen Alpoim, pela orientação institucional, possibilitando a realização do meu projecto de mestrado no Laboratório de Citogenética e Genómica da Universidade de Coimbra

À Ilda Ribeiro cuja co-orientação neste projeto foi crucial para uma contínua aprendizagem pessoal e científica. Muito obrigada pela receção calorosa e acolhedora que recebi, pelo companheirismo prestado, pelas horas infinitas que me disponibilizaste, por todos os esclarecimentos e ensinamentos prestados, pela grande contribuição na componente prática, discussão dos resultados e conclusões, pelo incentivo dado, por todo o apoio e amizade

A todos que trabalham no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela alegria e simpatia com que me receberam. Deste modo, individualmente, obrigada:

Ao José Ferrão por todo o apoio prestado, por toda a paciência demonstrada mesmo após “contaminações”, por todas as dicas e sugestões dadas para a realização prática deste projeto e pela contribuição na análise dos resultados

Ao Miguel Pires, pela ajuda muitas vezes imprescindível no manuseamento do material, por todas as críticas e sugestões, por todos os ensinamentos e obrigada pelo relaxamento musical

À Professora Joana Melo, Susana Ferreira, Patrícia Paiva, Cláudia Pais, Nuno Lavoura, Lúcia Simões, Alexandra Mascaranhas, Marta Pinho, Ana Jardim, Carla Henriques, Sónia Pereira e Susana Bacelar pela vossa disponibilidade sempre que necessitei para a elaboração deste projeto e pelo convívio

Ainda aos “estudantes” João Santos, Mariana Val, Mariana Alves, Sérgio Portovedo, João Fonseca, Hélder Gomes, Liliana Silva e Roberta Dutra, por todo o convívio, apoio, preocupação demonstrada e amizade

Ao Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC) em particular ao Dr. Artur Ferreira chefe do Serviço Maxilofacial, à Dra. Maria José Julião do Serviço de Anatomia Patológica e à Dra. Isabel Poiars Batista por toda a cooperação e disponibilidade prestada na elaboração deste projecto

Ao Dr. Francisco Marques por toda a dedicação e disponibilidade prestada na elaboração deste projecto, nomeadamente na recolha de todas as amostras utilizadas neste trabalho

A todos os pacientes e respetiva família que generosamente permitiram a utilização das suas amostras. Sem a sua autorização este trabalho não teria sido possível de concretizar

À Ana Pires e Joana Jorge por me acompanharem durante este ano, pelo apoio, convívio, pelos momentos tristes e alegres que passamos juntas e acima de tudo muito obrigada pela boa amizade

A todos os amigos de Leiria e Coimbra por me “aturarem” ao longo destes anos

Ainda à minha enorme família:

Aos meus pais que com todo o esforço sempre me disponibilizaram tudo o que necessitei para crescer pessoalmente e também profissionalmente, por todo o apoio e carinho

Aos meus irmãos e cunhados que com a sua alegria sempre me apoiaram ao longo da minha vida e ainda aos meus lindos sobrinhos, Rita, Mara, Inês, Tiago e Miguel que com a sua despreocupação e euforia me permitiram relaxar nos momentos mais críticos

Ao João pela paciência, compreensão e carinho nos momentos baixos e pelo incondicional apoio durante todos estes anos

ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO CARCINOMA PAVIMENTO-CELULAR DA CAVIDADE ORAL

Resumo

O carcinoma pavimento-celular da cavidade oral (CPCCO) representa um grupo de neoplasias, de origem epitelial, localizadas em diversos locais anatómicos da cavidade oral. As taxas de incidência e mortalidade associadas a esta neoplasia são elevadas, especialmente nos países desenvolvidos. O CPCCO representa a nível mundial a décima neoplasia mais comum nos homens, sendo mais frequente em indivíduos do género masculino do que feminino (2:1). Nas últimas décadas foram realizados progressos consideráveis na terapêutica para esta neoplasia, contudo estes não foram acompanhados pelo aumento da sobrevida a 5 anos. Uma das principais razões para este facto reside na realização do diagnóstico tardio. Deste modo é necessário a investigação genética para a deteção da doença em estadios iniciais de desenvolvimento, através do estudo de potenciais biomarcadores associados ao cancro oral. O objetivo principal deste trabalho consiste no estudo das alterações genéticas e epigenéticas de 30 amostras de CPCCO através da técnica de MS-MLPA. Simultaneamente foi pretendido validar o material parafinizado para estudos retrospectivos. A análise por MS-MLPA demonstrou alteração no número de cópias e no perfil de metilação de 37 genes supressores tumorais, sendo as alterações mais frequentes encontradas nos genes *WT1*, *GSTP1*, *BRCA1*, *GATA5*, *CDKN2A*, *PYCARD*, *PAX5*, *MLH3*, *MSH6*, *CASR* e *TP53*. Os resultados obtidos na comparação entre as amostras de tecido fresco e parafinizado foram de forma geral satisfatórios. Em conclusão, este trabalho permitiu verificar algumas alterações moleculares concordantes com as alterações referidas na literatura como associadas ao CPCCO, assim como associar alterações em determinadas regiões cromossómicas ou genes com o desenvolvimento tumoral. Desta forma, este estudo contribui para a abordagem de potenciais biomarcadores com potencial valor para o diagnóstico e prognóstico. Contudo novos estudos devem ser realizados com um *n* amostral superior, de forma a estabelecer uma correlação entre as características clínico-patológicas e o genótipo, determinar com maior precisão os genes associados ao desenvolvimento e progressão do cancro oral, assim como aumentar a concordância entre as amostras de tecido fresco e parafinizado.

Palavras-chave – Carcinoma pavimento-celular da cavidade oral (CPCCO), Mecanismos moleculares, Metilação de DNA, MS-MLPA

METHYLATION PROFILE ANALYSIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Abstract

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents a group of epithelial origin cancer located at different anatomical sites of oral cavity. Oral cancer incidence and mortality rates are high worldwide, especially in developed countries. OSCC represents globally the tenth most common cancer in men and is more frequent in men than in women (2:1). In the last decades considerable progress has been made in the treatment for this disease, however this was not accompanied by increased survival beyond 5 years. One of the main reason for this discrepancy seems to be the late diagnosis. Therefore it is necessary the detection of the disease in early stages of development through the study of potential genetic biomarkers associated with oral cancer. The main goal of this work was the study of genetic and epigenetic alterations of 30 OSCC samples by MS-MLPA. The analysis of MS-MLPA showed changes in copy number and methylation profile of 37 tumor suppressor genes. Additionally was also intended to validate the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue for retrospective studies. The most frequent alterations were found in *WT1*, *GSTP1*, *BRCA1*, *GATA5*, *CDKN2A* *PYCARD*, *PAX5*, *MLH3*, *MSH6*, *CASR* and *TP53* genes. In conclusion, this work showed some molecular aberrations consistent with those already described in the literature as associated with OSCC, as well as the involvement of certain chromosomal regions or genes associated with tumor development. Thus, this study highlighted some putative new biomarkers with possible diagnostic and prognostic value. Further studies enrolling a larger cohort are needed in order to validate these putative biomarkers as well as increase the agreement between fresh and FFPE samples.

Keywords – Oral squamous cell carcinoma (OSCC), Molecular mechanisms, DNA methylation, MS-MLPA

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTAS DE TABELAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	1
1. CARCINOMA PAVIMENTO-CELULAR DA CAVIDADE ORAL	2
2. PROGRESSÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA	3
3. EPIDEMIOLOGIA	8
4. FATORES DE RISCO	11
5. SINTOMAS E DIAGNÓSTICO	15
6. TERAPÊUTICA	17
7. MECANISMOS MOLECULARES	20
7.1. Potenciais biomarcadores associados ao CPCCO	24
8. TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DO CARCINOMA DA CAVIDADE ORAL	29
8.1. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	30
8.2. MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	31
9. AMOSTRAS	33
10. OBJETIVOS	34
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS	37
1. PACIENTES E AMOSTRAS	37
2. EXTRAÇÃO DE DNA	39
3. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS	39
4. ANÁLISE POR MS-MLPA	40
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
CAPÍTULO III – RESULTADOS	45
1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO	45
2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS	46
3. ANÁLISE POR MS-MLPA	47
3.1. Resultados obtidos por MS-MLPA em biópsia de tecido tumoral fresco	47
3.1.1 Alterações no número de cópias	48
3.1.2 Alterações no padrão de metilação	52
3.2. Comparação dos resultados obtidos por MS-MLPA em biópsia de tecido tumoral fresco e tecido tumoral incluído em parafina	54

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO DE RESULTADOS	58
1. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR MS-MLPA	58
1.1. Discussão dos resultados obtidos por MS-MLPA para o tecido tumoral fresco	58
1.2. Discussão da comparação dos resultados obtidos por MS-MLPA entre o tecido tumoral fresco e parafinado	65
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	71
PRESPECTIVAS FUTURAS DE INVESTIGAÇÃO	73
CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	xvii
CAPÍTULO VII – ANEXOS	xxxiii

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração anatômica da cavidade oral representando possíveis locais para o alojamento do carcinoma pavimento celular (CPC). Adaptado de *Encyclopaedia Britannica*.....2
- Figura 2** - Progressão clínica e histológica de uma hiperplasia simples, passando por estados displásicos, até à formação de um carcinoma pavimento-celular (CPC) invasivo. Adaptado de *Pai e Westra, 2009*.....3
- Figura 3** - Corte histológico de um carcinoma pavimento-celular típico mostrando evidências de diferenciação pavimentosa (*), produção de queratina e presença de junções celulares. Adaptado de *Pai e Westra, 2009*.....4
- Figura 4** - Imagens representativas de lesões potencialmente malignas do carcinoma pavimento-celular da cavidade oral (CPCCO), localizadas na mucosa do pavimento bucal. A) Leucoplasia B) Eritroplasia (*). Adaptado de *Pindborg, et al, 1997*.....5
- Figura 5** - Ilustração representativa da relação entre o campo de cancerização e os diversos tipos de recidiva local. Adaptado de *Leemans, et al, 2010*.....5
- Figura 6** - Taxa de incidência do cancro da cavidade oral em indivíduos de ambos os sexos, a nível mundial. Dados, com idade padronizada, expressos por 100 000 indivíduos (ASR). Adaptado de *GLOBOCAN 2008*.....8
- Figura 7** - Taxa de mortalidade do cancro da cavidade oral em indivíduos de ambos os sexos, a nível mundial. Dados com idade padronizada, expressos por 100 000 indivíduos (ASR). Adaptado de *GLOBOCAN 2008*.....11
- Figura 8** - Mecanismos de desregulação do ciclo celular promovidas pela expressão das oncoproteínas E6 e E7 do vírus do papiloma humano (HPV). Adaptado de *Leemans, et al, 2010*.....13
- Figura 9** - Representação da palpação de estruturas intra-orais utilizado no rastreio para o cancro oral. Adaptado de *Rizzolo, 2007*.....16
- Figura 10** - Adaptações fisiológicas ocorridas nas células tumorais durante o desenvolvimento neoplásico. Adaptado de *Hanahan e Weinberg, 2011*.....20
- Figura 11** - Ideograma com a localização das regiões cromossômicas frequentemente alteradas no CPCCO. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.....23

Figura 12 - Principais vias de sinalização celular mediadas pela ativação do recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Adaptado de <i>Brambilla e Gazdar, 2009</i>	26
Figura 13 - Representação esquemática das etapas da técnica Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) com e sem a clivagem pela enzima de restrição. <i>M</i> indica o grupo metilo (CH ₃); <i>PCR</i> significa Polimerase Chain Reaction. Adaptado de <i>MRC-Holland</i>	31
Figura 14 - Representação esquemática de um ideograma com os genes supressores tumorais analisados neste trabalho pela técnica de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas ME002. Adaptado de <i>Vincent-Chong et al, 2013</i>	42
Figura 15 - Representação esquemática dos diferentes locais anatómicos onde se encontram localizados os tumores dos 30 pacientes em estudo.....	45
Figura 16 – Representação dos resultados obtidos na eletroforese em gel de agarose 2,5%. Legenda: MM- marcador de peso molecular; 1- amostra controlo parafina; 2- amostra parafina Paciente 1; 3- amostra parafina Paciente 7; 4- amostra parafina Paciente 9; 5- amostra parafina Paciente 11; 6 - amostra parafina Paciente 12; 7/8- amostra parafina/fresco Paciente 14; 9/10- amostras parafina/fresco Paciente 16; 11/12- amostra parafina/fresco Paciente 25; 13/14- amostras parafina/fresco Paciente 26; 15/16- amostras parafina/fresco Paciente 28; 17- amostra controlo fresco.....	46
Figura 17 – Eletroferograma representativo de uma reação de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas ME002. Os eletroferogramas apresentados correspondem a um controlo feminino (1,2). As sondas representadas com * no eletroferograma 2 indicam as sondas sem local de restrição para a enzima <i>HhaI</i>	47
Figura 18 – Eletroferograma representativo de uma reação de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas ME002. Os eletroferogramas apresentados correspondem ao paciente 5, do sexo masculino (3,4). As sondas representadas com * no eletroferograma 4 indicam as sondas sem local de restrição para a enzima <i>HhaI</i>	48
Figura 19 – Gráfico representativo dos genes com maior número de ganhos e perdas no material genético, nas 30 amostras de tecido tumoral fresco analisadas. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.....	49
Figura 20 – Procedimento experimental de extração de DNA a partir de amostras de tecido fresco pelo método High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).....	xxxiv
Figura 21 - Procedimento experimental de extração de DNA a partir de amostras de tecido incluído em parafina pelo método QIAamp DNA FFPE Tissue. Adaptado de QIAGEN.....	xxxv

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Sistema classificativo TNM para a avaliação clínica do carcinoma da cavidade oral. Adaptado de <i>Neville, et al, 2002</i>	6
Tabela II - Agrupamento dos diferentes estadios tendo em conta o sistema classificativo TNM. Adaptado de <i>Neville, et al, 2002</i>	7
Tabela III - Características clínicas e biológicas do carcinoma da cabeça e pescoço (CCP) na presença (HPV-positivo) e ausência (HPV-negativo) de infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Adaptado de <i>Pai e Westra, 2009</i> e <i>Leemans, et al, 2011</i>	14
Tabela IV - Características clínicas dos pacientes com carcinoma pavimento-celular da cavidade oral incluídos no estudo. Legenda: ♂ (sexo masculino), ♀ (sexo feminino); CIR (Cirurgia), RT (Radioterapia), QT (Quimioterapia).....	38
Tabela V - Resultados obtidos das alterações no número de cópias das amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes envolvidos no estudo, utilizando o painel de sondas ME002. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético..	51
Tabela VI - Resultados obtidos do padrão de metilação de 25 genes supressores tumorais, de amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes envolvidos no estudo, utilizando o painel de sondas ME002. Legenda: ○ - genes que não se encontram metilados (metilação < 25%); ● - genes metilados (25-50%); ● - genes hipermetilados (51-100%).....	53
Tabela VII – Comparação dos resultados obtidos no padrão de metilação das amostras de tecido fresco (F) e incluído em parafina (P) de dez pacientes. Legenda: ○ - genes que não se encontram metilados (metilação ≤ 25%); ● - genes metilados (26-100%).....	54
Tabela VIII – Nome e localização dos genes estudados pela técnica de MS-MLPA recorrendo ao painel de sondas <i>SALSA MLPA probemix ME002-C1 Tumour Suppressor</i>	xxxvi

LISTA DE ANEXOS

- Anexo I** – Modelo de consentimento informado preenchido por todos os pacientes envolvidos no estudo.....xxxiii
- Anexo II** – Protocolo de extração de DNA genómico a partir de tecidos fresco recorrendo ao método High Pure PCR Template Preparation Kit.xxxiv
- Anexo III** – Protocolo de extração de DNA genómico a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina recorrendo ao método DNA FFPE Tissue Kit.....xxxv
- Anexo IV** – Designação dos genes estudados pela técnica de MS-MLPA.....xxxvi
- Anexo V** – Protocolo da técnica de MS-MLPA (Methylation-specific Multiplex Ligation Probe Amplification).....xxxvii
- Anexo VI** – Resultados obtidos das alterações no número de cópias das amostras de tecido tumoral fresco de 30 pacientes com CPCCO, utilizando o painel de sondas ME002. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.....xxxviii
- Anexo VII** – Resultados obtidos do padrão de metilação de 25 genes supressores tumorais, de amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes com CPCCO, utilizando o painel de sondas ME002. Legenda: □ - genes não metilados (metilação < 25%); ■ - genes metilados (25-50%); ■ - genes hipermetilados (51-100%).....xxxix
- Anexo VIII** – Comparação dos resultados obtidos no padrão de metilação das amostras de tecido fresco (F) e incluído em parafina (P) de dez pacientes. Legenda: □ - genes não metilados (metilação ≤ 25%); ■ - genes metilados (metilação de 26-100%).....xl

LISTA DE ABREVIATURAS

- aCGH** – array-based Comparative Genomic Hybridization
- ADAM5P** – ADAM metallopeptidase domain 5, pseudogene
- Akt** – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
- APC** – Adenomatosis polyposis coli
- ATM** – Ataxia telangiectasia mutated
- BCL2** – B-cell CLL/lymphoma 2
- BRCA1** – Breast cancer 1, early onset
- BRCA2** – Breast cancer 2, early onset
- CADM1** – Cell adhesion molecule 1
- CCNA1** – Cyclin A1
- CCND1** – Cyclin D1
- CCND2** – Cyclin D2
- CCO** – Carcinoma da Cavidade Oral
- CD44** – CD44 molecule
- CDH1** – Cadherin 1, type 1, E-cadherin
- CDK** – Cyclin-Dependent Kinase
- CDKN2A** – Cyclin-dependent kinase 2A
- CDKN2B** – Cyclin-dependent kinase 2B
- CHFR** – Checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase
- CPC** – Carcinoma Pavimento-Celular
- CPCCO** – Carcinoma Pavimento-Celular da Cavidade Oral
- CPCCP** – Carcinoma Pavimento-Celular da Cabeça e Pescoço
- CTTN** – Cortactin
- DAPK1** – Death-associated protein kinase 1
- DCC** – Deleted in colorectal carcinoma
- EBV** – Epstein-Barr Virus
- EGF** – Epidermal Growth Factor
- EGFR** – Epidermal Growth Factor Receptor
- ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ERK** – Extracellular signal-regulated kinases
- FANCD2** – Fanconi anemia, complementation group D2
- FANCG** – Fanconi anemia, complementation group G

FDA – Food and Drug Administration
FFPE – Formalin-fixed paraffin-embedded
FHIT – Fragile histidine triad
FISH – Fluorescent *in situ* Hybridization
HPLC-MS – High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
HPV – Human Papiloma Virus
HRAS – v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Jak – Janus kinase
KRAS – v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH – Loss of Heterozygosity
MAPK – Mitogen-activated protein kinase
Max – Partner protein myc-associated factor X
MGAM – Maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)
MGMT – O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLH1 – MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (*E.coli*)
MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRI – Magnetic Resonance Imaging
MSH2 – MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (*E.coli*)
MSH6 – MutS homolog 6 (*E.coli*)
MS-MLPA – Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSP – Methylation-specific Polymerase chain reaction
MYC – v-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
OSCC – Oral squamous cell carcinoma
PCR – Polymerase Chain Reaction
PET – Positron Emission Tomography
PI3K – Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA – Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PTEN – Fosfate and tensil homolog
Raf – Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RARB – Retinoic acid receptor, beta
Ras – Rat Sarcoma virus
RASSF1A – Ras association domain family member 1
RBI – Retinoblastoma 1

RT-qPCR – real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SNPs – Single-Nucleotide Polymorphism

STAT – Sterol O-acyltransferase 1

TGF- α – Transforming Growth Factor alpha

TP53 – Tumor protein p53

TP73 – Tumor protein p75

TSC1 – Tuberous sclerosis 1

TSC2 – Tuberous sclerosis 1

VEGFR – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL – von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase

WHO - World Health Organization

X-ray CT – X-ray Computed Tomography

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

O cancro é a uma doença caracterizada por uma população de células com crescimento e divisão anormal, podendo desta forma invadir e destruir outros tecidos e órgãos adjacentes. Desde o início da história da medicina que existem evidências de cancro, sendo os primeiros registos datados de 1600 a.C. Existem diversos tipos de cancro, sendo estes geralmente classificados de acordo com a sua localização anatómica e origem celular.

O carcinoma pavimento-celular da cabeça e pescoço (CPCCP) caracteriza-se por um conjunto de neoplasias heterogéneas com origem nas células do revestimento epitelial do trato aerodigestivo superior, podendo estar localizada em diversos locais anatómicos como a cavidade oral, faringe, laringe, seio paranasal e glândulas salivares.¹ Esta patologia apresenta elevadas taxas de incidência e mortalidade a nível mundial, sendo considerada a sexta neoplasia mais frequente nos países desenvolvidos.² A maior parte dos CPCCP está localizada na cavidade oral e faringe, encontrando-se desta forma o cancro oral incluído neste grupo de carcinomas pavimento-celulares.

O aumento da incidência do carcinoma pavimento-celular da cavidade oral (CPCCO) a nível mundial resulta principalmente do crescimento e envelhecimento da população assim como das alterações no seu estilo de vida, como o tabagismo, alcoolismo, inatividade física e dietas ocidentalizadas.³

Também em Portugal se verificam elevadas taxas de incidência e mortalidade associadas ao cancro oral, representando este em 2008, a sexta neoplasia mais comum em indivíduos do sexo masculino.⁴

Deste modo é evidente a necessidade de desenvolver a investigação oncológica, através da avaliação da progressão clínica e dos mecanismos moleculares envolvidos no processo carcinogénico, podendo desta forma contribuir não só para auxiliar o diagnóstico e prognóstico, como também potenciar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1. CARCINOMA PAVIMENTO-CELULAR DA CAVIDADE ORAL

A cavidade oral encontra-se revestida por tecido epitelial pavimentoso estratificado que varia ligeiramente na sua espessura e nível de queratinização em função da exposição a forças de mastigação (Figura 1).

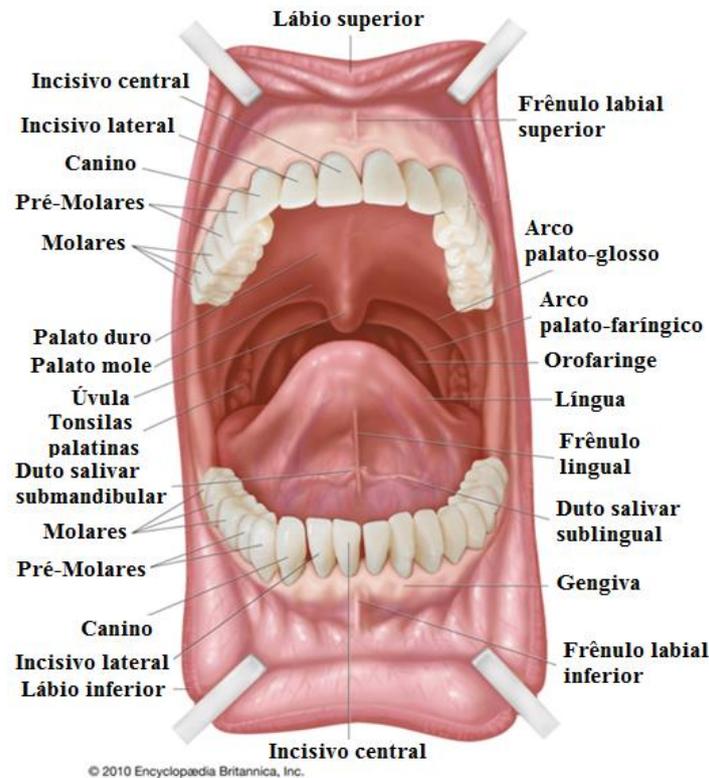


Figura 1 - Ilustração anatômica da cavidade oral representando as possíveis localizações para o carcinoma pavimento celular (CPC). Adaptado de Encyclopaedia Britannica⁵

Aproximadamente 90% dos tumores da cavidade oral possuem origem nas células do tecido epitelial pavimentoso, sendo estes classificados histologicamente como carcinomas pavimento-celulares da cavidade oral¹, também designados por carcinomas epidermóides ou de células escamosas.

O CPCCO apresenta elevada heterogeneidade e proliferação relativamente rápida, apresentando um potencial de duplicação médio de 6-7 dias.⁶ Este carcinoma pode manifestar vários graus de diferenciação pavimentosa, a sua progressão local é considerada invasiva podendo envolver, através de metastização, os gânglios linfáticos regionais.⁷

Esta neoplasia pode encontrar-se localizada em diversos locais anatómicos, sendo os locais mais comuns a língua (37%), lábios (22%), pavimento bucal (13%), glândulas salivares (12%), mucosa jugal (6%), gengiva (6%) e palato (4%).⁸

2. PROGRESSÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA

As alterações histológicas sequenciais que culminam no aparecimento de cancro oral (Figura 2) correspondem à acumulação de anomalias genéticas resultando no rearranjo cromossómico e perda de funções celulares.⁸

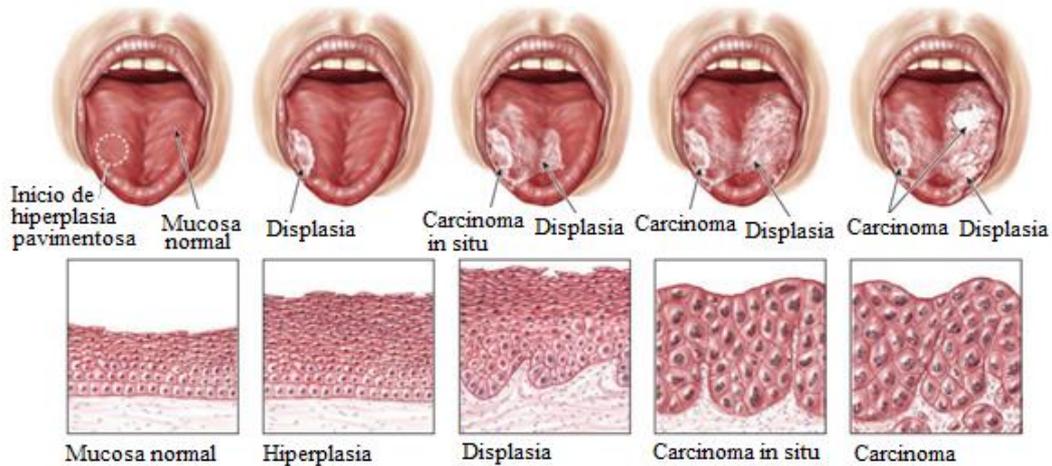


Figura 2 - Progressão clínica e histológica de uma hiperplasia simples, passando por estados displásicos, até à formação de um carcinoma pavimento-celular invasivo. Adaptado de Pai e Westra, 2009¹

As alterações iniciais consistem no aumento anormal da actividade mitótica celular sendo possível observar no tecido o aumento do número de células (hiperplasia pavimentosa). O termo displasia é utilizado para designar a ocorrência de alterações neoplásicas que ocorrem à superfície do tecido epitelial, antes da invasão de tecidos conjuntivos subepiteliais. Estas alterações correspondem à reorganização celular anormal, aumento da actividade mitótica e aumento nuclear com pleomorfismo, sendo normalmente classificadas numa escala de três parâmetros baseado no grau de severidade de atipia celular. A classificação resulta de uma avaliação subjetiva do anatomopatologista e designa-se por displasia leve se a atipia celular atingir apenas 1/3 do epitélio, moderada se atingir até 2/3 e grave se atingir todo o epitélio. A presença de displasia epitelial é regularmente considerada uma das mais importantes condições para o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas. Com o crescimento da displasia o carcinoma *in situ* pode invadir a membrana basal e infiltrar-se nos tecidos conjuntivos subepiteliais através de projeções. Em estados avançados de crescimento tumoral as projeções formadas podem invadir o músculo-esquelético, o tecido ósseo craniofacial e a pele facial. Com a progressão do carcinoma as células tumorais possuem a capacidade de se libertar do tumor primário, perdendo a sua interação com as células e migrando do tecido de origem. Após a invasão da matriz extracelular e migração pelo estroma

intersticial ocorre a formação de novos vasos sanguíneos e/ou linfáticos (angiogênese) essenciais para a expansão tumoral.^{1,7-9}

A nível histológico o CPC é definido como um neoplasma epitelial maligno que apresenta características de diferenciação pavimentosa, como a produção de queratina e/ou a presença de junções celulares.¹⁰ A aparência microscópica do carcinoma pode variar em função da sua diferenciação, contudo um CPC típico possui diferenciação moderada (Figura 3).¹

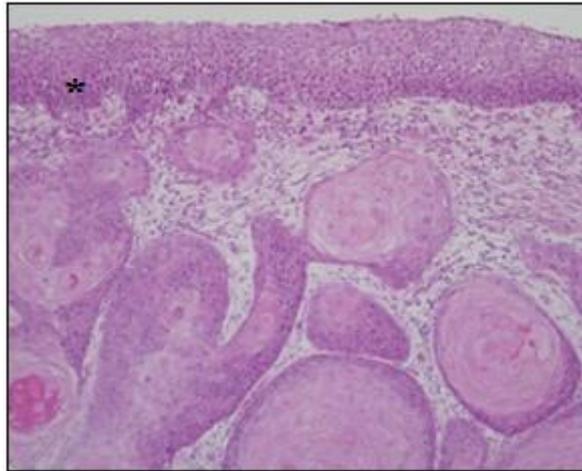


Figura 3 – Corte histológico de um carcinoma pavimento-celular típico mostrando evidências de diferenciação pavimentosa (*), produção de queratina e presença de junções celulares. Adaptado de Pai e Westra, 2009¹

Histologicamente, não se verificam diferenças microscópicas entre os CPC presentes na cavidade oral e os carcinomas localizados noutros locais da cabeça e pescoço.¹⁰

As lesões potencialmente malignas iniciam-se geralmente com o aparecimento de lesões avermelhadas na mucosa bucal indicando a presença de dilatação capilar e inflamação (eritema), ocorrendo de seguida a destruição da integridade epitelial com disrupção da lâmina basal (ulceração). Com o desenvolvimento da lesão ocorre o aparecimento de rugosidades superficiais e endurecimento do tecido epitelial.

Dois exemplos de lesões potencialmente malignas da cavidade oral são a leucoplasia (Figura 4A), onde se verifica o aparecimento de uma placa esbranquiçada à superfície do epitélio, não removível por raspagem, com excesso de produção de queratina e a eritroplasia (Figura 4B) que corresponde a lesões menos comuns e mais agressivas, onde se verifica o aparecimento de lesões avermelhadas e aveludadas semelhantes a uma inflamação.⁸

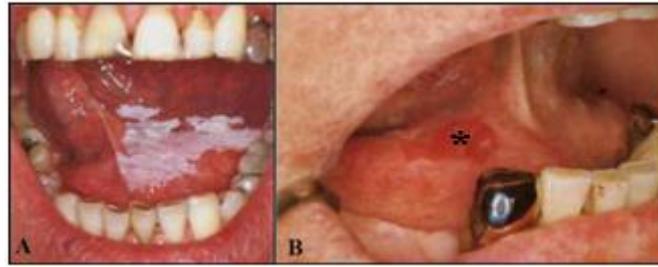


Figura 4 - Imagens representativas de lesões potencialmente malignas do carcinoma pavimento-celular da cavidade oral, localizadas na mucosa do pavimento bucal. **A)** Leucoplasia **B)** Eritroplasia (*). Adaptado de Pindborg, *et al*, 1997¹⁰

Um aspeto importante na avaliação clínica de pacientes que apresentam lesões potencialmente malignas ou carcinomas pavimento-celulares é o conhecimento do conceito de campo de cancerização. Slaughter e colaboradores,¹¹ em 1953 definiram pela primeira vez este conceito, onde descreveram o padrão histológico deste tipo de tumores e referiram a presença de alterações clínicas e histopatológicas nas margens clinicamente normais do carcinoma oral. O campo de cancerização é caracterizado pela existência de um grupo de células que sofrem influência do meio e exibem alterações que posteriormente originam carcinomas em localizações temporais e espaciais distintas. A descrição da estrutura de DNA realizada por Watson e Crick, permitiu evoluir o conceito de campo de cancerização, passando este a incorporar também as alterações moleculares. O campo de cancerização é explicado não só pela presença de células intactas mas geneticamente danificadas como também pela presença de certos padrões comportamentais do tumor, como é o exemplo da recidiva local após a completa ressecção cirúrgica (Figura 5).^{11,12}

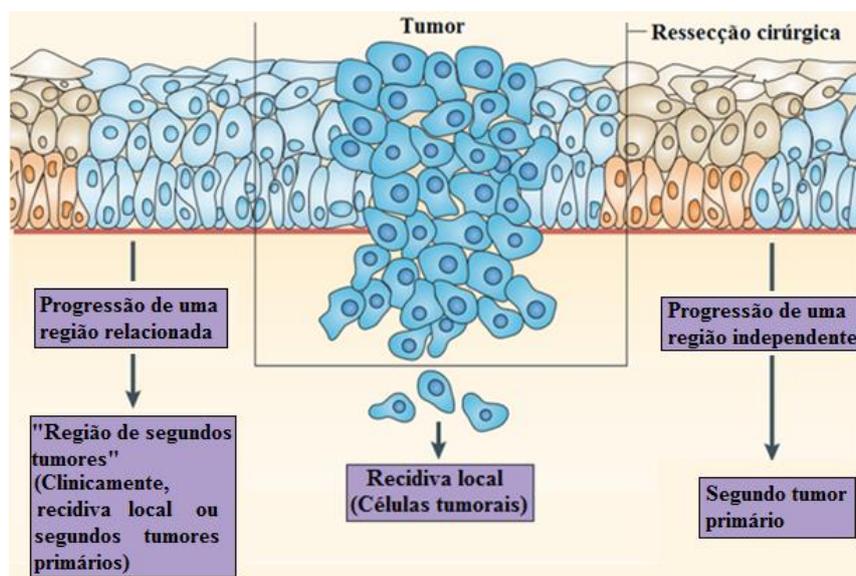


Figura 5 - Ilustração representativa da relação entre o campo de cancerização e os diversos tipos de recidiva local. Adaptado de Leemans, *et al*, 2010²

A recidiva local é definida de acordo com os critérios clínicos como o aparecimento de um tumor a uma distância inferior a 2 cm do tumor primário e no prazo de 3 anos após o tumor inicial, ocorrendo aproximadamente em 10-30% dos pacientes com estadios avançados de CPCCO. O desenvolvimento de recidivas regionais ocorre em cerca de 10% dos pacientes e aproximadamente 10-25% dos pacientes apresentam o desenvolvimento de metástases distantes. O aparecimento de segundos tumores primários, localizados no mesmo local ou em locais distantes do tumor inicial, ocorre a uma taxa constante de aproximadamente 2-3% por ano. Para definir os segundos tumores primários são utilizados os critérios elaborados por Warren e Gates¹³ em 1932, onde referem que cada tumor deve apresentar um padrão distinto de malignidade, os tumores devem ser distintos e que a probabilidade de um tumor corresponder a uma metástase do outro deve ser excluída.¹⁴

As neoplasias apresentam elevada heterogeneidade, sendo deste modo essencial a existência de sistemas de classificação para os descrever.

O estudo clínico do CPCCO é baseado no sistema classificativo TNM, sendo este indispensável para a sistematização do estudo clínico da patologia em causa. Este sistema é essencialmente anatómico e estabelece uma uniformização dos critérios de estadiamento do tumor, partindo do princípio de que os estadios menos avançados possuem prognóstico mais favorável.¹⁵

A descrição da extensão anatómica do tumor é baseada na avaliação de três parâmetros, onde T representa a extensão do tumor primário na sua maior dimensão, N o envolvimento ou não de gânglios linfáticos regionais através de implementação metastática e M a presença ou não de metastização à distância. Para a classificação patológica (pTNM) as categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M respetivamente.^{10,16,17} A tabela I apresenta o sistema classificativo TNM utilizado para a avaliação clínica do carcinoma da cavidade oral.

Tabela I - Sistema classificativo TNM para a avaliação clínica do carcinoma da cavidade oral. Adaptado de Neville, *et al*, 2002¹⁶

Tumor primário (T)	
Tx	Tumor primário sem avaliação
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor até 2 cm
T2	Tumor entre 2-4 cm
T3	Tumor com mais de 4 cm
T4	Tumor disseminado para estruturas adjacentes

Envolvimento de gânglios linfáticos (N)

Nx	Gânglios linfáticos regionais sem avaliação
N0	Sem evidência de gânglios linfáticos regionais
N1	Metástase num único gânglio linfático, homolateral até 3 cm
N2	Metástase em gânglios homolaterais entre 3-6 cm
N3	Metástase em gânglio linfático com mais de 6 cm

Metastização distante (M)

Mx	Metastização distante sem avaliação
M0	Sem evidência de metastização distante
M1	Presença de metastização distante

Deste modo é possível, para cada paciente, avaliar e conjugar as três categorias individuais de T, N e M, resultando o agrupamento em quatro estadios diferentes, de I a IV, conforme evidenciado na tabela II.

Tabela II - Agrupamento dos diferentes estadios tendo em conta o sistema classificativo TNM. Adaptado de Neville, *et al*, 2002¹⁶

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estadio IV	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	N0, N1, N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

A avaliação adequada do tumor utilizando este sistema classificativo é fundamental para a escolha e avaliação do tratamento a realizar, bem como a determinação da sobrevivência e prognóstico de cada paciente. Contudo esta classificação não considera alguns factores de grande importância, como por exemplo o relacionamento com as características do tumor ou as interações deste com o hospedeiro, não sendo desta forma suficiente para o prognóstico da doença. Para além disso esta classificação baseia-se no pressuposto de que tumores malignos com a mesma histologia e com a mesma localização anatómica possuem padrões semelhantes de invasão, risco de metastização e prognóstico.^{7,15}

Para uma análise mais aprofundada do tumor é comum a utilização de outros sistemas de classificação em conjugação com o sistema TNM. A avaliação histológica do tumor, realizada através da visualização das células neoplásicas ao microscópio, é executada pelo médico patologista de forma a avaliar o grau do tumor. Esta classificação, de acordo com o método descrito originalmente por Broders¹⁸ e adotado

pela *World Health Organization* (WHO)¹⁰, avalia o grau de queratinização, o pleomorfismo celular e nuclear e a atividade mitótica do tecido observado, originando um sistema de classificação de três categorias distintas: Grau 1 (elevado nível de diferenciação), Grau 2 (moderadamente diferenciado) e Grau 3 (baixo nível de diferenciação). Um tumor que apresente diferentes graus de diferenciação é classificado tendo em conta o seu grau de diferenciação mais elevado.^{15,19}

3. EPIDEMIOLOGIA

O cancro da cavidade oral (CCO) apresenta elevadas taxas de incidência a nível mundial, verificando-se maior incidência nos países desenvolvidos. No ano 2008 foram diagnosticados no total 263 020 novos casos, apresentando uma taxa de incidência, com idade padronizada, de 3,8 por 100 000 habitantes⁴ (Figura 6).

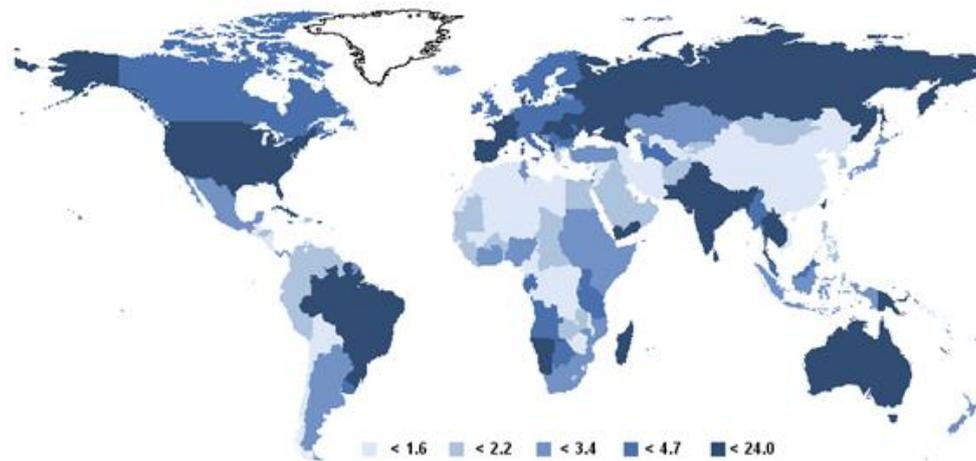


Figura 6 - Taxa de incidência do cancro da cavidade oral em indivíduos de ambos os sexos, a nível mundial. Dados, com idade padronizada, expressos por 100 000 indivíduos (ASR). Adaptado de GLOBOCAN 2008.⁴

Esta patologia é considerada a nível mundial a décima neoplasia mais comum nos homens, sendo mais frequente nos indivíduos do sexo masculino (170 496 homens diagnosticados no ano 2008).⁴ Segundo Warnakulasuriya²⁰ em 2009, o risco dos Europeus desenvolverem cancro oral e da faringe é estimado para os homens em aproximadamente 1,85% e 0,37% para as mulheres. Contudo evidências demonstram que a diferença na incidência desta neoplasia entre ambos os sexos tem vindo a diminuir na última metade do século, uma vez que os hábitos comportamentais das mulheres têm vindo a assemelhar-se aos dos homens, no que diz respeito à exposição a factores carcinogénicos, como a exposição a tabaco e álcool.¹

Apesar das elevadas taxas de incidência de cancro oral nos países desenvolvidos, alguns países localizados a sul da Ásia apresentam taxas de incidência muito elevadas. Estudos epidemiológicos indicam que a Índia é considerado o país com maior incidência de cancro oral no mundo, registando por ano aproximadamente 100 000 novos casos. Outros países, também localizados a sul da Ásia, como Sri Lanka, Paquistão e Bangladesh apresentam elevadas taxas de incidência de cancro oral, contribuindo esta neoplasia para o aumento em 25% de todos os tipos de cancro registados nestes países.²⁰ As elevadas taxas de incidência de cancro oral ocorridas nestes países encontram-se relacionadas maioritariamente com o consumo de preparados de tabaco para mascar contendo noz de areca ou folha de betel, ao qual se podem adicionar ainda algumas especiarias, nomeadamente açafão, anis, mostarda, entre outras (designados por *pan*).¹⁶ A noz de areca (semente da palmeira de areca), vulgarmente utilizada nestes preparados, é constituída por alcaloides (como a arecolina), sendo considerado um dos principais produtos psicoactivos e largamente consumido por homens, mulheres e até crianças nestes países.²¹ Evidências epidemiológicas sugerem que o hábito de consumo de preparados para mascar contendo tabaco aumenta o risco relativo de desenvolvimento de CPCCO e outras lesões na cavidade oral.²²

Em Portugal o carcinoma da cavidade oral foi considerado a sexta neoplasia mais comum nos homens, sendo diagnosticados no ano 2008, 777 indivíduos do sexo masculino (cuja incidência, com idade padronizada, é de 9,9 por 100 000 habitantes) e 248 indivíduos do sexo feminino (2,1 por 100 000 habitantes) com esta patologia.^{4,23,24} Durante os últimos 25 anos ocorreram alterações acentuadas na sociedade e economia de Portugal. Inicialmente com uma população pobre, com baixos níveis de educação e com a agricultura como principal actividade, Portugal tem desenvolvido o seu estilo de vida, transformando-se numa sociedade urbana típica de países desenvolvidos do século XXI. O impacto desta transformação conduziu a alterações na prevalência e estabelecimento de vários factores de risco para o aparecimento de cancro, como o consumo de tabaco, álcool, alterações na dieta e nos padrões reprodutivos, resultando no aumento da incidência e mortalidade associadas a esta patologia.²⁵ A incidência de cancro oral neste país apresenta variações regionais consideráveis sendo mais frequente esta patologia nas regiões Sul de Portugal, onde a prevalência de fumadores é mais elevada em ambos os sexos.⁷

A nível mundial o número de indivíduos afetados por cancro oral tende a aumentar, apresentando uma prevalência a 5 anos (para a população acima dos 15 anos de idade)

de 610 656 indivíduos (representando 2,1% da população mundial).⁴ A elevada taxa de prevalência registrada na atualidade pode dever-se não só à realização tardia do diagnóstico da patologia em causa como também ao aumento do envelhecimento da população mundial, uma vez que esta neoplasia é mais comum em indivíduos com mais de 40 anos.^{2,15}

O CPCCO corresponde a uma doença rara em indivíduos jovens.²⁶ Contudo evidências demonstram o aumento de 3% registrado em 1973 para 6% em 1993 da incidência de cancro na língua em pacientes com idade inferior a 40 anos, podendo este ser atribuído ao crescimento do número de fumadores entre a população mais jovem.²⁷ Evidências sugerem que o cancro oral em indivíduos jovens pode apresentar um comportamento distinto, exibindo uma etiologia e progressão diferente quando comparada com pacientes mais velhos.²⁸ Encontra-se descrito na literatura uma relação entre o diagnóstico de cancro oral e a idade, indicando que o diagnóstico em indivíduos jovens se encontra associado à diminuição da taxa de sobrevivência.²⁷ A diminuição da sobrevivência em grupos jovens pode ser atribuída à presença frequente de tumores com envolvimento linfático nos estadios iniciais independente do tamanho do tumor.²⁹ Tsukuda e colaboradores²⁷ sugerem ainda que indivíduos jovens com esta patologia possuem vulgarmente tumores com baixo grau de diferenciação, podendo desta forma influenciar o prognóstico.

Estudos epidemiológicos demonstram também diferenças nas taxas de incidência e mortalidade associadas ao cancro entre os diferentes grupos étnicos.³⁰ Diversos estudos descrevem uma maior incidência e mortalidade associada ao CPCCO em indivíduos Afro-Americanos quando comparados com Americanos.^{31,32} Contudo não existe ainda consenso acerca das causas para as diferenças nas taxas de incidência e mortalidade entre etnias, podendo alguns fatores como as diferenças no acesso aos cuidados de saúde, a altura do diagnóstico, diferenças na dieta e no consumo de tabaco e álcool estar na origem destas diferenças.^{30,33}

Esta patologia apresenta também uma mortalidade elevada a nível mundial, registando-se no ano de 2008 aproximadamente 127 654 mortes, apresentando uma taxa de mortalidade de 1,9 por 100 000 indivíduos (Figura 7).⁴ As elevadas taxas de mortalidade causadas por esta neoplasia podem ser atribuídas essencialmente ao diagnóstico tardio, contribuindo este para o presente prognóstico global de sobrevivência a 5 anos, inferior a 30% para os estadios III e IV.⁷

A mortalidade registada em Portugal, à semelhança do que acontece a nível mundial, é elevada apresentando para indivíduos do sexo masculino 272 mortes no ano 2008 (cuja taxa de mortalidade é 3.3 em 100 000 habitantes) e para indivíduos do sexo feminino 69 mortes (representando uma taxa de 0,5 em 100 000 indivíduos).⁴

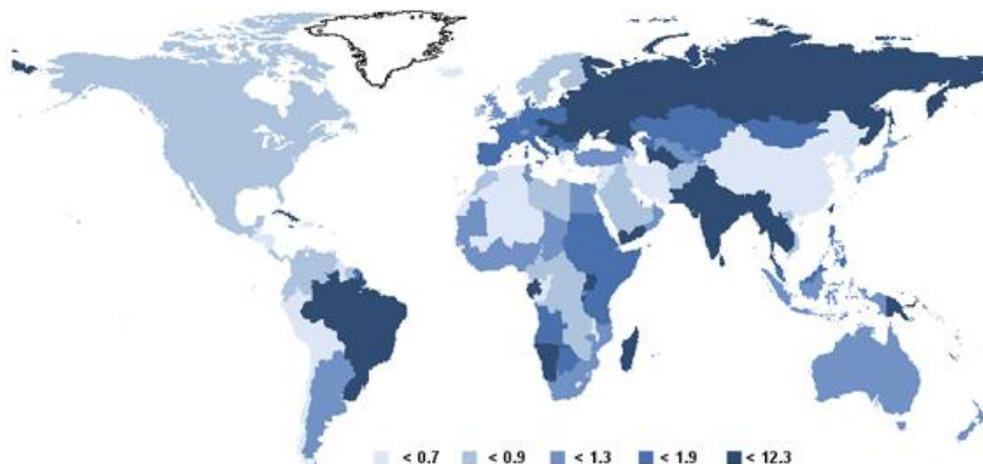


Figura 7 - Taxa de mortalidade do cancro da cavidade oral em indivíduos de ambos os sexos, a nível mundial. Dados com idade padronizada, expressos por 100 000 indivíduos (ASR). Adaptado de GLOBOCAN 2008.⁴

4. FATORES DE RISCO

Os principais fatores de risco associados ao CPCCO são o consumo excessivo de tabaco e álcool, especialmente quando consumidos em conjunto, uma vez que possuem um efeito sinérgico.^{2,27} Aproximadamente 80% dos casos de cancro oral diagnosticados nos países desenvolvidos são atribuídos ao consumo individual ou combinado de tabaco e álcool.³⁴

Estudos verificaram que o consumo de tabaco representa o fator de risco dominante para o CPCCO e que a intensidade e duração do consumo apresentam correlação com o risco de desenvolvimento desta neoplasia.¹ Diversos estudos demonstraram que a cessação do consumo de tabaco diminui, mas não elimina o risco de desenvolvimento de cancro, verificando-se melhoria no estado clínico dos pacientes que interrompem o consumo durante a radioterapia.^{1,34} A exposição passiva ao fumo do tabaco mostrou ser também um fator determinante no aumento da incidência de cancro.¹ O efeito nefasto do consumo de tabaco, fumado (cigarro ou cachimbo) ou mascado, pode ser atribuído não só às propriedades carcinogénicas das substâncias libertadas durante o período de combustão, como nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos, como também à exposição do tecido a elevadas temperaturas provocando dano direto sobre as mucosas, afetando especialmente as regiões não queratinizadas.^{1,35} Alguns mecanismos propostos

para os efeitos do consumo de tabaco sugerem a indução de hipoxia crónica no tumor e de mutações no gene *TP53*, dificultando deste modo o tratamento por radioterapia. A inalação de monóxido de carbono libertado no fumo do tabaco promove a sua ligação à hemoglobina por competição com o oxigénio, impedindo o transporte eficiente deste para os tecidos.³⁴

O álcool por si só, não é considerado um agente cancerígeno direto, contudo a sua metabolização pela enzima álcool desidrogenase leva à formação de acetaldeído que pode intercalar no DNA interferindo com a sua síntese e reparação.¹ O mecanismo pelo qual o consumo de álcool resulta no desenvolvimento de cancro não se encontra bem definido, contudo alguns mecanismos estabelecidos sugerem que este pode atuar como solvente, facilitando a passagem de substâncias cancerígenas (adquiridas no consumo de tabaco) através das membranas celulares, aumenta a actividade metabólica hepática e pode levar a alterações no metabolismo intracelular das células epiteliais. Verificou-se que a ingestão de elevadas concentrações de etanol pode promover também irritação local do tecido. Outro mecanismo proposto foi a ocorrência de dano da função celular, como a diminuição da função mitocondrial e o aumento da alquilação de DNA.^{27,36}

Aproximadamente 15-20% dos pacientes com carcinoma pavimento celular da cabeça e pescoço não apresentam qualquer relação com o consumo de tabaco ou álcool e possuem idades inferiores a 40 anos, sugerindo que o factor etiológico neste caso poderá corresponder à infeção viral.³⁷ O papel de determinados vírus como o vírus do papiloma humano (HPV) e o vírus de Epstein-Barr (EBV) no desenvolvimento e progressão da carcinogénese oral tem vindo a ser estudado nos últimos anos²⁷, uma vez que a presença de proteínas e mRNA destes vírus na maioria dos pacientes com esta neoplasia sugere que a infeção viral possa ter sido o agente responsável pela doença.³⁸ Encontra-se descrito na literatura que pacientes com cancro oral que apresentam infeção viral possuem diferenças patológicas e moleculares dos pacientes com esta neoplasia sem infeção viral, possuindo desta forma diferenças no prognóstico.²

A infeção pelo HPV pode estar na origem do aparecimento de cancro, uma vez que se verifica a integração de DNA genómico viral, nomeadamente os subtipos 16 e 18, em mais de 90% dos cancros cervicais³⁷ e em 70% dos cancros da orofaringe.¹ Existem mais de 100 subtipos virais de HPV, contudo alguns são considerados de “elevado risco” devido à sua presença em lesões neoplásicas², como é o caso dos subtipos 16, 18, 31, 33 e 35.³⁹ A infeção viral pelo HPV ocorre nas células basais do epitélio estratificado da pele ou mucosas. Após a invasão das células epiteliais através de

microlesões o vírus possui a capacidade proliferativa devido ao crescimento e expansão lateral das células epiteliais infetadas.⁴⁰

O controlo do ciclo celular é regulado por complexos ciclinas/CDKs (*cyclin-dependent kinases*) e pelos seus inibidores. Alguns dos inibidores importantes para o controlo do ciclo celular são a proteína p16 (codificada pelo gene *CDKN2A*) e a proteína p21 (codificada pelo gene *CDKN1A*). A proteína p53, também essencial para a regulação do ciclo celular, aumenta a sua expressão em resposta a diversos estímulos de stress promovendo a expressão de p21 que inibe a progressão do ciclo celular. A proteína Rb leva à inibição da expressão de fatores de transcrição essenciais para a progressão da fase S do ciclo celular.²

É estimado que o potencial oncogénico do vírus HPV resulta essencialmente de três oncoproteínas presentes no seu genoma, E5, E6 e E7. A proteína E5 parece ser essencial nos estados iniciais da infeção, estimulando o crescimento celular e prevenindo a apoptose, através da sua interação com recetores celulares, como o recetor do factor de crescimento epidermal (EGF).⁴⁰ A consequência molecular da expressão das oncoproteínas E6 e E7 é a inativação da expressão das proteínas p53 e retinoblastoma 1 (Rb) respectivamente, originando perturbação na regulação do ciclo celular, através da inibição da apoptose das células infetadas e da sua proliferação,² permitindo desta forma a replicação viral (Figura 8).

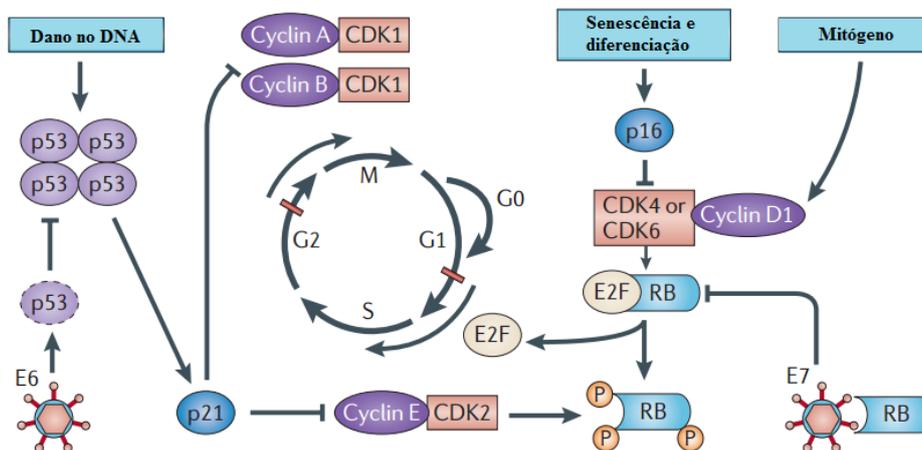


Figura 8 – Mecanismos de desregulação do ciclo celular promovidas pela expressão das oncoproteínas E6 e E7 do vírus do papiloma humano (HPV). Adaptado de Leemans, *et al*, 2010²

Diversos estudos relatam a existência de diferenças nas características clínicas, histológicas e moleculares do CPCCP entre pacientes que possuem infeção pelo vírus HPV e pacientes sem infeção viral. A principal distinção genética observada foi a menor tendência para a ocorrência de mutações no gene *TP53* em pacientes HPV-positivos.

Verificou-se também que pacientes com tumores HPV-positivos apresentam um prognóstico mais favorável do que tumores HPV-negativos,^{1,2} uma vez que a perda de função do gene *TP53* se encontra associada à resistência terapêutica, fenótipo agressivo e um pobre prognóstico da doença.⁴¹

Algumas das características principais que distinguem o carcinoma da cabeça e pescoço na presença e ausência de infecção viral por HPV encontram-se resumidas na tabela III.

Tabela III - Características clínicas e biológicas do carcinoma da cabeça e pescoço (CCP) na presença (HPV-positivo) e ausência (HPV-negativo) de infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Adaptado de Pai e Westra, 2009¹ e Leemans, *et al*, 2011².

Características	CCP HPV-positivo	CCP HPV-negativo
Incidência	Aumentada	Reduzida
Histopatologia	Fraca diferenciação	Diferenciação moderada, queratinização
Factor de risco	Sexo oral	Consumo excessivo de tabaco e álcool
Idade	Menos de 60 anos	Mais de 60 anos
Prognóstico	Favorável	Fraco

Outro vírus que pode estar na origem do aparecimento de cancro oral é o EBV, este pertence à mesma família que o vírus do *Herpes* possuindo grande capacidade para persistir no organismo humano durante longos períodos de tempo, podendo causar a doença de mononucleose. Este vírus é encontrado amplamente distribuído na natureza e estima-se que aproximadamente 90% dos adultos a nível mundial já foram infetados pelo EBV durante a sua adolescência.⁴² Shimakage e colaboradores³⁸ em 2002 demonstraram a capacidade do vírus EBV para infetar células epiteliais, persistindo no interior de linfócitos B, resultando na libertação de partículas virais a partir do epitélio oral. Diversos estudos verificaram a presença de mRNA e proteínas do vírus EBV na maioria dos casos de carcinoma da cavidade oral estudados, sugerindo que a infecção viral por EBV pode ter sido o agente causador deste tipo de neoplasias.^{38,42,43} Llewellyn e colaboradores²⁷ sugerem em 2001, que pacientes com cancro oral que apresentam marcadores virais de EBV possuem um prognóstico mais favorável e taxas de sobrevivência superiores do que pacientes EBV-negativos.

Diversos estudos relatam a existência de outros fatores de risco que podem estar na origem e desenvolvimento do cancro da cavidade oral. A falta de higiene oral pode contribuir para o aparecimento e desenvolvimento de lesões potencialmente malignas na cavidade oral, contribuindo desta forma para o desenvolvimento de CPCCO. Outro fator de risco que pode contribuir para o aparecimento de cancro oral é a presença de uma dieta rica em gorduras animais, verificando-se que uma alimentação rica em frutas, vegetais, peixe e óleos vegetais possui efeitos protetores para este tipo de neoplasia. As

variações genéticas desempenham também um papel importante na etiologia desta neoplasia, sendo este facto sustentado pelo aumento da incidência da doença em familiares de primeiro grau de pacientes com a mesma patologia.^{27,35,44}

5. SINTOMAS E DIAGNÓSTICO

O rastreio de lesões potencialmente malignas na cavidade oral constitui uma estratégia atrativa para reduzir as elevadas taxas de incidência e prevalência desta patologia a nível mundial.⁴⁵

O prognóstico do CPCCO depende largamente do estadio de desenvolvimento do tumor na altura do diagnóstico, verificando-se a diminuição da taxa de sobrevivência com o aumento do desenvolvimento tumoral. O prognóstico é relativamente pobre apresentando uma taxa de sobrevivência a 5 anos após o diagnóstico, de aproximadamente 82% para pacientes com tumores localizados e apenas 33% para pacientes com estadios avançados da doença.⁴⁶

Os estadios iniciais do CPCCO são geralmente assintomáticos, apresentando por vezes uma ligeira irritação. Com o desenvolvimento do carcinoma os pacientes detetam o aparecimento de uma ulceração à superfície do epitélio. Apenas em estadios tardios de desenvolvimento tumoral ocorre o aparecimento de dor e sangramento no tecido, com posterior perda da dentição.^{8,16} Aproximadamente 50% dos pacientes com esta patologia possuem estadios de desenvolvimento tumoral bastante avançados (T3 e T4) na altura do diagnóstico, sendo esta a principal causa pela qual esta neoplasia apresenta elevadas taxas de mortalidade.⁶

Langevin e colaboradores⁴⁶ relataram em 2012 que a ida frequente ao dentista ou consultas de clínica oral se encontra associada ao aumento do diagnóstico de cancro oral em estadios de desenvolvimento iniciais.

Apesar de não ser prática comum em Portugal, na atualidade o rastreio desta neoplasia é realizado geralmente por profissionais de saúde através do exame visual convencional. O exame físico pode levar à deteção deste tipo de carcinomas através não só da palpação de estruturas intra-orais, como a língua, lábios, palato e pavimento bucal (Figura 9) mas também através da palpação externa do pescoço, verificando a existência de nódulos linfáticos aumentados ou massas anormais, podendo ser ainda solicitados exames complementares como a radiografia.^{47,48}

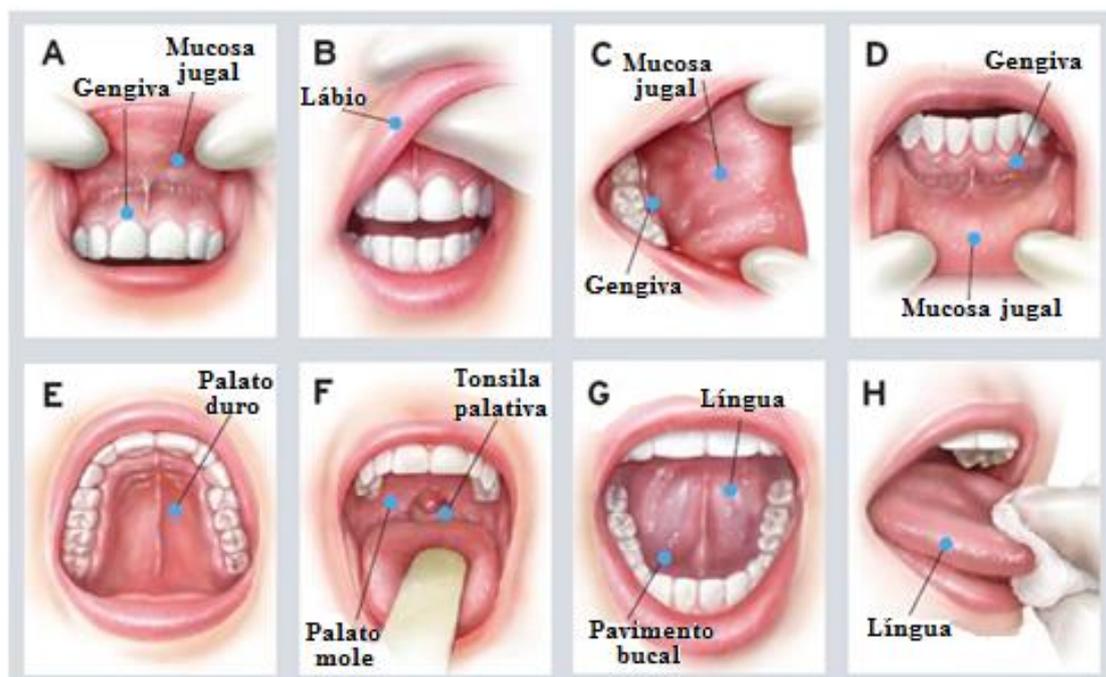


Figura 9 – Representação da palpação de estruturas intra-orais utilizado no rastreio para o cancro oral. Adaptado de Rizzolo, 2007⁴⁷

Contudo em caso de suspeita de cancro oral, o diagnóstico requer sempre a remoção de tecido epitelial para a sua avaliação histopatológica.⁶ A remoção de tecido, designado por biópsia, representa na atualidade o único método de diagnóstico, permitindo após visualização microscópica a confirmação do diagnóstico inicial assim como verificar a malignidade do tumor. Apesar desta técnica de diagnóstico ser relativamente simples de executar para o especialista, representa uma técnica invasiva e relativamente dolorosa para o paciente.⁶

Para a realização mais rigorosa da remoção de tecido maligno, podem ser utilizados métodos de visualização de lesões potencialmente malignas na cavidade oral que auxiliam os métodos de diagnóstico convencional, como é o exemplo a utilização do corante azul de toluidina. A aplicação de 1% de solução aquosa do corante azul de toluidina no local suspeito de lesão durante 30 segundos permite diferenciar as áreas de tecido normal das células do carcinoma *in situ*, uma vez que este cora os ácidos nucleicos de azul e polissacarídeos de roxo. Esta técnica demonstrou elevada sensibilidade e moderada especificidade para lesões malignas, reportando falsos negativos em casos de displasia leve a moderada. A utilização deste corante permite distinguir as margens das lesões potencialmente malignas na cavidade oral,⁴⁹ podendo ser útil para localizar a lesão durante a realização de uma biópsia de tecido.

A análise molecular do CPCCO tem sido levada a cabo por diversos investigadores que recorrem a outros métodos de remoção de células, uma vez que a biópsia representa um método bastante invasivo proporcionando desconforto para os pacientes.⁴⁸⁻⁵⁰

A análise genómica e metabonómica de carcinomas, nomeadamente da cavidade oral, apresenta uma estratégia promissora que pode servir no futuro para a realização do diagnóstico deste tipo de neoplasia. A instabilidade genómica contribui para o desenvolvimento da neoplasia podendo a visualização das alterações no DNA distinguir lesões displásicas que progridem para carcinomas pavimento-celulares. É hoje conceptual que lesões potencialmente malignas e CPCCO apresentam alterações na expressão do genoma, contudo verifica-se também a ocorrência de alterações na concentração de determinados metabolitos. Deste modo, Mehrotra e Gupta⁴⁹ em 2011 referem que a análise de determinadas macromoléculas específicas, como enzimas, citocinas, metaloproteases, fatores de crescimento e transcritos de DNA e mRNA, a partir de amostras de saliva representaria um método prático e relativamente barato para o rastreio de grandes populações. Franzmann e colaboradores⁵¹ em 2005, determinaram a expressão da proteína solúvel CD44 (solCD44) através do teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), na saliva de pacientes com CPCCP, referindo a eficiência deste ensaio na deteção deste carcinoma em todos os estadios da doença. Também Xie e colaboradores⁵² em 2012, demonstraram a presença metabolitos, através da análise por HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) e NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), na urina, sangue ou saliva de pacientes com estadios iniciais de CPCCO que podem servir como marcadores metabólicos promissores para um futuro diagnóstico desta neoplasia.

Desta forma a prevenção contra o cancro, nomeadamente o cancro oral, passa por reduzir o consumo de tabaco e álcool e por frequentar com regularidade consultas de saúde oral onde possam ser detetadas antecipadamente lesões potencialmente malignas. O aumento da divulgação na comunicação social de informação acerca desta neoplasia fatal poderá prevenir e contribuir para o diagnóstico da doença numa fase onde é possível a cura, proporcionando um aumento na saúde pública e diminuição dos custos económicos associados à neoplasia.

6. TERAPÊUTICA

Para a determinação do prognóstico e do estabelecimento do plano terapêutico a seguir é geralmente utilizada a avaliação do estadio do tumor primário.^{8,53} O exame

físico, a biópsia do tecido, assim como estudos que incluem X-ray CT (*X-ray Computed Tomography*), MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) e PET (*Positron Emission Tomography*) representam técnicas úteis para a avaliação do estadio do tumor.⁸

O tratamento do cancro oral incide essencialmente na remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e/ou quimioterapia, dependendo do estadio e natureza do tumor.⁵⁴

Alguns fatores adicionais à terapêutica, como a nutrição, estado de saúde, consumo de tabaco ou álcool e rigor no tratamento são importantes para o aumento da eficácia do tratamento.⁸

A remoção cirúrgica do tumor por si só não garante a remoção de células neoplásicas na totalidade, sendo este tratamento mais adequado para tumores localizados. Para um tratamento mais eficaz é geralmente utilizado como adjuvantes pós-operatórios a radioterapia e/ou quimioterapia. Após a remoção do tumor e exame das margens de excisão pode verificar-se ainda a existência de células neoplásicas residuais, sendo provável neste caso o desenvolvimento de recidivas locais ou metástases distantes. Nesta situação pode ser realizado uma excisão mais alargada do tecido e a utilização de terapias adicionais como o caso da radioterapia pós-operatória.⁵⁵

Os pacientes com estadios iniciais da doença (estadio I e II) são geralmente submetidos a cirurgia e/ou radioterapia com principal objetivo o tratamento total. Para estadios mais avançados da doença (estadio III) é normalmente utilizado a combinação de terapia local (através de cirurgia e/ou radioterapia) com quimioterapia sistémica. Contudo para pacientes que apresentam estadios muito avançados da doença, onde se verifica a presença de metástases distantes, apenas é utilizada a quimioterapia como tratamento paliativo.^{55,56} Após tratamento existem algumas deficiências funcionais que estão relacionadas com o estadio da doença. A intensidade elevada de radiação e quimioterapia pode levar a algumas complicações como a perda de tecidos, redução da mobilidade da língua, perda da dentição, atrofia muscular, diminuição do paladar e da mastigação. Deste modo, o plano de tratamento considera a remoção do tumor e de tecido normal circundante tendo em conta a preservação da anatomia e fisiologia.⁸

Na última década o estudo clínico do cancro da cabeça e pescoço incidiu no melhoramento da radioterapia e quimioterapia, tendo como alvo certas vias de sinalização associadas à carcinogénese.⁵⁵ Para alcançar melhoria na terapêutica é necessário o desenvolvimento de fármacos específicos para cada neoplasia⁵⁴, tendo o número de biomarcadores aumentado nos últimos anos.

O conhecimento dos mecanismos moleculares associados à carcinogênese oral permite o desenvolvimento de novas terapêuticas que incidem em componentes moleculares específicos que se encontram associados ao crescimento e desenvolvimento tumoral.¹ Diversos estudos referem que a frequente sobreexpressão de EGFR se encontra bem documentada em diversas neoplasias, incluindo no CPCCP, sendo esta sobreexpressão associada a elevadas taxas de recorrência e um pobre prognóstico da doença.^{1,55} Apesar de aproximadamente 90% dos CPCCP apresentarem sobreexpressão de EGFR, apenas uma pequena quantidade demonstram amplificações no número de cópias ou mutações no gene *EGFR*.¹ Deste modo, duas estratégias principais surgiram nos últimos anos para a terapêutica do CPCCO, com resultados promissores, que incluem a utilização de fármacos específicos com capacidade para I) Bloquear a via de sinalização mediada pela ativação de recetores EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e II) Bloquear a via de sinalização mediada pela ativação de recetores VEGFR (*Vascular Endotelial Growth Factor Receptor*). A inativação das vias de sinalização anteriormente referidas promove a inibição da proliferação das células neoplásicas e impede a formação de angiogénese, respetivamente.⁵⁵

O Cetuximab corresponde ao primeiro e único agente biológico aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2006 para comercialização na terapêutica do CPCCP. Este fármaco corresponde a um anticorpo monoclonal quimérico com capacidade para se ligar ao domínio extracelular do EGFR, com maior afinidade que os ligandos EGF (*Epidermal Growth Factor*) e TGF- α (*Transforming Growth Factor alpha*). Outros agentes terapêuticos estudados como o erlotinib e o gefitinib, são pequenas moléculas com capacidade para se ligar ao domínio intracelular do EGFR, inibindo a via de sinalização mediada pela ativação deste recetor. A ligação destes fármacos ao recetor impede a sua dimerização e ativação, levando à inibição da proliferação, angiogénese e metastização tumoral e promovendo a indução da apoptose das células neoplásicas.^{1,55}

Contudo apesar dos grandes avanços nos métodos terapêuticos e de diagnóstico assim como nos mecanismos moleculares envolvidos no CPCCO é necessário detectar a doença em estadios iniciais de desenvolvimento tumoral. A introdução do rastreio para o cancro oral na prática médica, através da examinação de estruturas intra-orais e palpação externa da cabeça e pescoço, realizada pelos médicos dentistas ou por outros profissionais de saúde permite detetar o desenvolvimento de lesões ou até carcinomas em estadios iniciais, permitindo desta forma a cura completa desta neoplasia.

7. MECANISMOS MOLECULARES

As alterações genéticas podem ocorrer nas células da linha germinativa, sendo estas transmitidas à descendência, ou nas células somáticas onde são mais comuns. Estas alterações resultam em perturbações nas vias de sinalização celular que conduzem as vias de proliferação e homeostase celular.

O desenvolvimento de um tumor corresponde em geral à acumulação de alterações genéticas e epigenéticas nas células, resultando num elevado número de eventos que permitem a sobrevivência e crescimento descontrolado de células neoplásicas. As características adquiridas pelas células neoplásicas consistem na manutenção de sinais proliferativos e no silenciamento de supressores de crescimento que proporcionam o aumento do potencial replicativo, resistência à morte celular, desregulação da energética celular, indução da angiogénese, invasão de tecidos e metastização. A aquisição das diversas adaptações referidas provém essencialmente de mecanismos de inflamação providos pelo tumor, da instabilidade genómica e mutações na sequência de DNA das células neoplásicas (Figura 10).⁵⁷



Figura 10 - Adaptações fisiológicas ocorridas nas células tumorais durante o desenvolvimento neoplásico. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.⁵⁷

A análise genética de diversos tipos de tumores sólidos permitiu verificar a frequente presença de alterações em diferentes genes. As alterações genéticas e epigenéticas ocorridas nas células neoplásicas proporcionam a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais essenciais para o correto funcionamento do ciclo celular. A

aquisição ao longo do tempo das consecutivas alterações nas células somáticas promove o desenvolvimento e expansão tumoral.⁵⁸

Outro evento que distingue as células normais das células neoplásicas é a presença de aneuploidia que corresponde ao número anormal de cromossomas. Contudo ainda não se encontra bem esclarecido se este fenómeno representa a causa ou uma consequência dos processos de carcinogénese.⁵⁹ Duesberg e colaboradores⁶⁰ em 1998 sugerem que a instabilidade genética presente nas células neoplásicas resulta da presença de aneuploidia. A aneuploidia promove uma segregação assimétrica dos cromossomas durante a mitose, levando à formação de subpopulações celulares com elevado nível de instabilidade genética e heterogeneidade.⁶⁰ A poliploidia corresponde a um estado onde as células apresentam mais do que dois conjuntos de todos os cromossomas homólogos e surge como consequência do stress celular, envelhecimento e diversas patologias, devido a diversos mecanismos como a desregulação mitótica, falha na citocinese ou fusão celular induzida por vírus. A presença de poliploidia surge frequentemente durante os processos evolutivos contudo, tendo origem accidental, pode tornar-se prejudicial para o organismo. Evidências sugerem que a presença de células poliploides, geralmente tetraploides, são vulgarmente instáveis e que atuando como intermediários para a formação de aneuploidia proporcionam o aparecimento e progressão tumoral.⁵⁹

Para além da presença de aneuploidia nas células neoplásicas, é frequente a ocorrência de outras alterações na sequência de DNA como deleções, duplicações, inversões e translocações.⁵⁸

A presença de rearranjos genómicos pode originar o aparecimento de doenças congénitas e contribuir para o desenvolvimento de cancro. Estudos recentes demonstram que a complexidade de rearranjos genéticos nas células neoplásicas pode resultar na formação de um único evento dramático de alterações estruturais genéticas, designado por cromotripsis.^{61,62} Estudos indicam a presença deste fenómeno em aproximadamente 2-3% de todos os cancros, sendo particularmente prevalente no cancro do tecido ósseo (25%).^{61,63} A presença de cromotripsis nas células neoplásicas pode envolver dezenas ou centenas de genes, num ou vários cromossomas, envolvendo elevado número de quebras no DNA com consequente dano celular acentuado. Contudo o conhecimento dos mecanismos de formação de cromotripsis não se encontra ainda bem esclarecido. A enorme complexidade de quebras cromossómicas no genoma e a elevada heterogeneidade celular do tumor não permitiram ainda esclarecer se este

fenômeno ocorre num único evento dramático ou se provêm de sucessivas quebras no DNA durante o ciclo mitótico.⁶¹

Nos últimos anos foram realizados progressos consideráveis na determinação dos mecanismos genéticos associados ao CPCCO, contudo não foi possível ainda estabelecer uma correlação direta entre o fenótipo e o genótipo da doença. A carcinogênese da cavidade oral corresponde a um processo multifacetado modelado por diversos factores endógenos e ambientais, resultando na desregulação celular com dano na sinalização celular, crescimento celular e outros mecanismos de reparação de DNA. As alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento e progressão do CPCCO provêm de danos irreversíveis na sequência de DNA que incluem deleções, ampliações e outras alterações que proporcionam a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais.^{64,65}

A descrição do modelo de progressão molecular da carcinogênese refere que 1) a progressão tumoral ocorre através da ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais, 2) o número de alterações genéticas ocorridas aumenta progressivamente com o desenvolvimento do tumor, vagamente seguindo uma ordem sequencial e que 3) a perda e ganho de material genético ocorrem preferencialmente em genes fundamentais para as principais vias de sinalização associadas ao crescimento, proliferação e adesão celular.^{1,66,67}

A presença de estudos que incidem na análise das alterações genéticas ocorridas maioritariamente no desenvolvimento de displasias ou carcinomas da cavidade oral têm sido levadas a cabo por diversos investigadores utilizando variadas metodologias, demonstrando claras evidências da presença de dano no DNA nesta neoplasia.⁶⁵

Tu e colaboradores⁶⁸ descrevem que as alterações cromossômicas são características comuns nos tumores e que ampliações nas regiões 3q26, 8q, 11q13 e 20q são habituais em estadios iniciais de CPCCO. Também Cha e colaboradores⁶⁴ em 2010 referem que a análise genética em amostras de CPCCO demonstra a presença de amplificação genética principalmente nos cromossomas 3q, 8q, 9q e 11q e perdas genéticas nos cromossomas 3p, 4q e 9p. Outros estudos referem que deleções nos cromossomas 3p e 9p ocorrem nos estadios iniciais de desenvolvimento tumoral, seguido de amplificação do gene *CCND1* e deleções que envolvem os cromossomas 8p, 13p, 17p, e 18p.^{67,69} Em 2012 Mishra⁷⁰ refere a presença de diversos estudos que demonstram que as principais regiões cromossômicas frequentemente amplificadas no cancro oral são *CCND1* (11q13), *MYC* (8q24), *EGFR* (7p13-22) e *BCL2* (18q21),

enquanto regiões como *CDKN2A* (9p21), *TP53* (17p13) e *APC* (5q21-22) se encontram frequentemente deletadas nesta neoplasia. Também Vincent-Chong e colaboradores⁷¹ em 2013, após a análise de tecido de CPCCO através das técnicas aCGH (*array-Comparative Genomic Hybridization*) e RT-qPCR (*real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), demonstram a frequente amplificação das regiões cromossômicas 8p11 (*ADAM5P*), 7q34 (*MGAM*) e 20p13.1 (*SIRPB1*) e sugerem que a sobreexpressão dos genes *ADAM5P* e *MGAM* no tecido podem funcionar como biomarcadores para esta neoplasia (Figura 11).

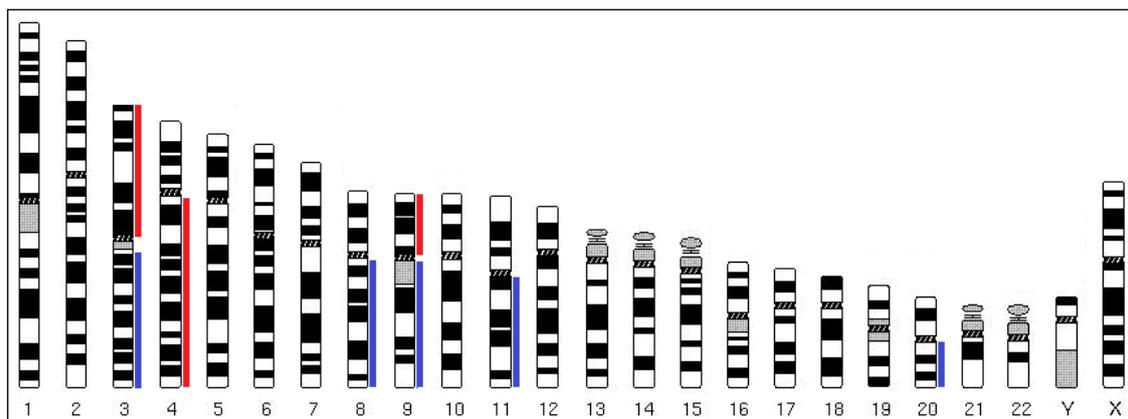


Figura 11 – Ideograma com a localização das regiões cromossômicas frequentemente alteradas no CPCCO. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.

A epigenética é também um factor bastante importante no desenvolvimento e progressão do carcinoma da cavidade oral. Os mecanismos epigenéticos consistem na mudança da expressão génica sem alteração da sequência de DNA, como é o exemplo a metilação de DNA, modificação de histonas (por metilação ou acetilação) e silenciamento de genes mediado por moléculas de RNA. A metilação de DNA corresponde ao mecanismo epigenético mais comum e consiste na adição covalente de um grupo metilo (CH_3) ao carbono 5 de uma citosina que geralmente precede a uma guanina (ilha CpG) e se encontra vulgarmente presente em zonas promotoras dos genes.^{72,73} A metilação, pela ação de DNA metiltransferases, de ilhas CpG que se encontram junto a promotores promove o silenciamento genético. A compreensão dos mecanismos epigenéticos, nomeadamente a metilação do DNA, exige o conhecimento dos padrões de distribuição de metilação ao longo de todo o genoma.⁷⁴ A metilação de DNA corresponde a um processo essencial no desenvolvimento e diferenciação celular do organismo, podendo este ser utilizado na defesa contra DNA parasita ou outros elementos. Os padrões de metilação do genoma são também transmitidos à descendência, contudo a metilação é removida de todo o genoma durante o

desenvolvimento embrionário, sendo depois restabelecida ao longo das várias divisões do ciclo celular durante o desenvolvimento.⁷⁵

A presença de alterações nos padrões de metilação encontra-se associada a diversas neoplasias, uma vez que o dano nos mecanismos epigenéticos pode contribuir para o silenciamento de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes comprometendo a expressão genética e levando ao desenvolvimento de cancro.^{72,76} O conhecimento das alterações epigenéticas ocorridas nas diversas neoplasias pode contribuir não só para auxiliar o diagnóstico e prognóstico, como também promover o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.⁷⁷ Deste modo, na última década, diversos estudos têm demonstrado que a presença de alterações nos padrões de metilação possui um importante papel no desenvolvimento da carcinogénese oral.^{70,75} A análise epigenética do CPCCO demonstrou a frequente presença de metilação nos genes *CDKN2A* (9p21), *CDKN2B* (9p21), *CCNA1* (13q12.3-q13), *ATM* (11q22-q23), *RARB* (3p24.2), *DAPK1* (9q21.33), *RASSF1A* (3p21.3), *TP73* (1p36.3), *CDHI* (16q22.1), *MGMT* (10q26), *MLH1* (3p21.3) e *DCC* (18q21.3). Estes genes encontram-se envolvidos em importantes vias de sinalização celular que controlam a progressão do ciclo celular, apoptose, adesão celular, reparação de DNA e invasão tumoral.^{72,73} Worsham e colaboradores⁷⁸ em 2006 através da técnica MS-MLPA (*Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) demonstraram que os genes *APC*, *CADMI*, *TP73* e *DAPK1* se encontram frequentemente metilados em amostras de CPCCP. A presença de metilação no promotor do gene *MLH1* em amostras de cancro oral foi demonstrada por González-Ramírez e colaboradores⁷⁹ em 2010 através da técnica MSP (*Methylation-Specific Polymerase chain reaction*). Este gene encontra-se envolvido no sistema de reparação de DNA, deste modo o silenciamento da sua expressão promove a acumulação de danos no DNA com conseqüente instabilidade genómica.⁷⁹ Liu e colaboradores,⁸⁰ após a análise de amostras de CPCCO demonstraram a frequente presença de hipermetilação no gene *DAPK1*, que se encontra envolvido nos processos apoptóticos, indicando que este pode funcionar como um futuro biomarcador para os estadios iniciais de desenvolvimento da carcinogénese oral.

7.1. Potenciais biomarcadores associados ao CPCCO

O conceito de biomarcador corresponde a um parâmetro bioquímico, molecular ou genético que pode ser medido e avaliado para verificar a presença e progressão de uma doença. Com a revolução molecular diversos biomarcadores foram estudados para

aprofundar o conhecimento do envolvimento das vias de sinalização molecular na iniciação e progressão tumoral. No passado os biomarcadores eram utilizados como indicadores do prognóstico de pacientes com CPCCP. Contudo recentemente a importância da utilização dos biomarcadores aumentou, uma vez que estes permitem verificar diversos aspectos da saúde dos pacientes, desde a detecção do tumor até às estratégias terapêuticas a aplicar.¹

A expansão de uma massa celular designada a nível clínico como neoplasma é causada por lesões estruturais e funcionais em regiões genéticas específicas, designados por genes carcinogénicos. Os principais genes carcinogénicos encontram-se em duas classes principais, oncogenes e genes supressores tumorais. O equilíbrio entre estas duas classes permite a manutenção da homeostase celular. Deste modo a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais compromete a homeostase proporcionando o desenvolvimento tumoral.⁸¹

7.1.1. Proto-oncogenes

Proto-oncogenes são genes responsáveis pelo controlo do ciclo celular, divisão e diferenciação, através de processos de sinalização celular para mecanismos de regulação da tradução e transcrição celular. Estes genes possuem uma expressão espacial e temporal controlada. A ocorrência de mutações pontuais, amplificações ou rearranjos cromossómicos nos proto-oncogenes origina oncogenes. A alteração na expressão destes genes, geralmente ganho de função, compromete o controlo do ciclo celular, proporcionando o desenvolvimento de neoplasias.^{81,82}

Alguns oncogenes possuem um papel relevante na carcinogénese oral, uma vez que estes codificam proteínas que regulam os mecanismos de proliferação celular e apoptose conferindo desta forma vantagem de crescimento ou aumento de sobrevivência das células neoplásicas.⁸¹ São exemplo de proto-oncogenes os genes *EGFR*, *PIK3CA*, *MYC* e *CCND1*.

O gene *EGFR* (7p13) pertence à família *Human Epidermal Growth Factor Receptor* (HER)/Erb-B dos recetores do fator de crescimento tirosina cinase. Este recetor encontra-se localizado à superfície da membrana celular e é ativado pela ligação dos ligandos EGF ou TGF- α ao domínio extracelular após a sua homo ou heterodimerização e fosforilação. Este recetor quando ativado desempenha um importante papel na ativação de diversas vias de sinalização como as vias reguladas pelas proteínas MAPK, Akt, ERK e Jak/STAT, desencadeando uma cascata de processos bioquímicos

intracelulares envolvidos na indução da proliferação celular, invasão, angiogénese, metastização e inibição dos processos de apoptose (Figura 12).^{55,73,83} A expressão de EGFR é vulgarmente encontrada em diversos tecidos como é o exemplo o tecido epidermal, trato gastrointestinal e renal. Contudo a desregulação na via de sinalização mediada por este recetor é frequentemente encontrada na maioria dos cancros de origem epitelial, como o cancro do pulmão, colorectal, mama, próstata, ovário e CPCCP. Desta forma o proto-oncogene *EGFR*, localizado no braço curto do cromossoma 7, encontra-se descrito como um importante biomarcador em diversas neoplasias.^{84,85} Aproximadamente 90% dos pacientes com CPCCP apresentam sobreexpressão de EGFR mas apenas uma parte possui amplificações ou mutações no gene *EGFR*.^{1,85} A sobreexpressão deste gene e de outros membros da sua família encontra-se documentada no carcinoma da cavidade oral,⁸⁶ tendo sido detetadas amplificações em lesões potencialmente malignas da cavidade oral, sugerindo a existência de alterações neste gene nos estadios iniciais da doença.⁸⁷ Estudos indicam também a correlação entre a sobreexpressão de EGFR e um fraco prognóstico, maior agressividade da doença e baixos níveis de sobrevivência.^{85,88} Contudo têm sido desenvolvidos agentes anti-EGFR promissores para a terapêutica de diversos tumores sólidos, nomeadamente o cancro colorectal e o CPCCP. Estes agentes funcionam como anti-proliferativos permitindo a regressão do tumor.^{89,90}

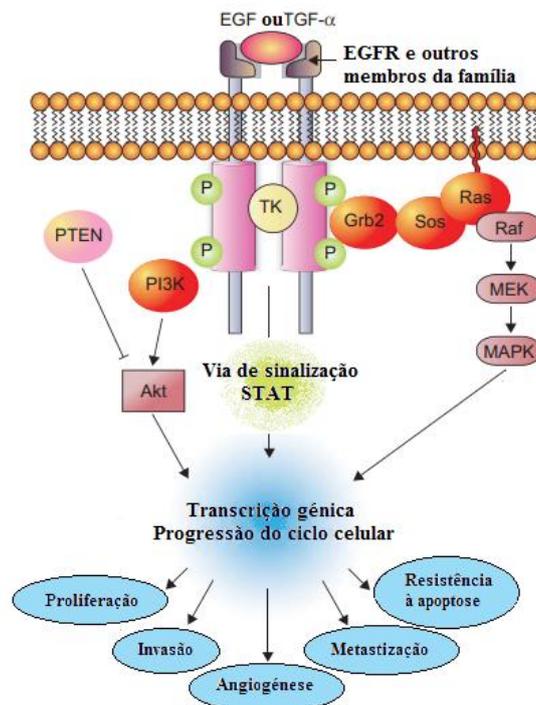


Figura 12 – Principais vias de sinalização celular mediadas pela ativação do recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Adaptado de Brambilla e Gazdar, 2009.⁸³

A proteína Ras é um importante regulador da via de sinalização ativada pelo EGFR.⁹¹ Diversos estudos afirmam que alterações na via de sinalização da Ras possuem um papel importante na proliferação descontrolada, invasão, angiogênese, metastização e resistência à radioterapia.⁹²⁻⁹⁴ Estudos afirmam também a ocorrência de mutações nos genes que codificam as proteínas Ras, Raf, PI3K, Akt, TSC1, TSC2 e alterações nestas vias de sinalização em diversas neoplasias.^{92,95} Huang e colaboradores⁹² demonstraram a presença de mutações nos genes *KRAS*, *HRAS* e hipermetilação dos genes *RASSF1A*, *RASSF2A* e *PTEN*, em pacientes com CPCCO tratados com radioterapia, encontrando-se estas alterações relacionadas com um fraco prognóstico da doença. A ativação da via de sinalização Ras/PI3K/Akt, através da ativação de Ras, mutação ou amplificação de PI3K, amplificação de Akt ou mutação/diminuição da expressão de *PTEN*, encontra-se associada com o aumento de migração, invasão e resistência à radioterapia nas células neoplásicas.⁹² Qiu e colaboradores⁹⁶ demonstram a presença frequente de mutações no gene *PIK3CA* em diversos tumores sólidos. Tu e colaboradores⁶⁸ também indicam a importância deste oncogene na carcinogênese oral, referindo que amplificações na região cromossômica 3q26, local onde reside o gene *PIK3CA*, são frequentes em CPCCO.

O gene *MYC*, localizado na região cromossômica 8q24.21, codifica o fator de transcrição que em conjunto com a proteína Max modela a transcrição de diversos genes específicos envolvidos nos processos do ciclo celular, apoptose, metabolismo celular e vias de adesão celular. Estudos indicam que a frequente sobreexpressão do gene *MYC* se deve à sua amplificação. Aproximadamente 20-40% dos câncros da cavidade oral na Europa e América apresentam amplificações no gene *MYC*, estando esta alteração associada à estimulação da proliferação e perda da diferenciação celular no CPCCO.^{81,97}

Outro gene com ênfase no estudo da carcinogênese oral é o *CCND1*, localizado na região cromossômica 11q13, codifica o elemento regulador ciclina D1 que associado às cinases CDK4 e CDK6 regula a transição da fase G1 para S do ciclo celular.⁹⁸ Evidências demonstram a presença de sobreexpressão e amplificação na região cromossômica 11q13, onde residem os genes *CCND1* e *CTTN* em neoplasias como o cancro da mama e o CPCCP.^{99,100} A sobreexpressão de ciclina D1 induz a desregulação da expressão de outros genes críticos para o funcionamento normal do ciclo celular, promovendo vantagem no crescimento das células neoplasias levando à progressão da carcinogênese.⁹⁹

7.1.2. Genes supressores tumorais

Genes supressores tumorais são genes que codificam proteínas com função de reguladores celulares negativos, inibindo a proliferação celular e prevenindo o desenvolvimento de cancro. A presença de mutações pontuais, deleções ou rearranjos cromossômicos em ambas as cópias do gene pode proporcionar a inativação de genes supressores tumorais, comprometendo desta forma o controlo do ciclo celular e levar ao desenvolvimento de cancro.^{81,82} São exemplo de supressores tumorais, relevantes para a carcinogénese oral, os genes *TP53*, *RBI* e *CDKN2A*.

As vias de sinalização mediadas pelas proteínas p53 e Rb encontram-se universalmente desreguladas em amostras de CPCCP, indicando a sua importância no desenvolvimento e progressão da carcinogénese oral.¹

O gene *TP53* localiza-se na região cromossômica 17p13.1 e codifica uma proteína nuclear crucial para o controlo do ciclo celular através da regulação de mecanismos de reparação celular e processos apoptóticos. Esta proteína encontra-se expressa em baixos níveis e apresenta curta duração nos tecidos.¹⁰¹ Este gene supressor tumoral encontra-se frequentemente alterado em diversas neoplasias incluindo no CPCCP, onde aproximadamente 50% dos pacientes apresentam alterações neste gene. Estudos demonstram que as mutações ou deleções no gene *TP53*, assim como a sobreexpressão de p53 se encontram relacionadas com tumores mais agressivos e metastização tumoral promovendo um fraco prognóstico e baixa sobrevivência.^{1,102-104} Contudo evidências demonstram que mutações no gene *TP53* são frequentes em lesões potencialmente malignas de pacientes com hábitos tabágicos⁷⁰ e que a acumulação de p53 é observada no epitélio oral histologicamente normal, adjacente ao tumor,¹⁰⁵ indicando que alterações neste gene ocorrem em estádios iniciais de desenvolvimento tumoral. A alteração mais frequente em p53 é a ocorrência de perda de função, verificando-se em mais de 50% dos pacientes com CPCCP a deleção génica na região cromossômica onde reside o gene *TP53*.¹

O gene *RBI* é também um gene supressor tumoral envolvido no controlo do ciclo celular. Este gene, localizado na região cromossômica 13q14, codifica uma proteína que quando hipofosforilada possui a capacidade de inativar o fator de transcrição EF1, essencial para a expressão de genes reguladores da fase S do ciclo celular.⁶⁵ A mutação ou diminuição de atividade em Rb proporciona a proliferação celular descontrolada. Estudos demonstram a presença frequente de mutações no gene *RBI*, sendo a perda de heterozigotia um evento comum em CPCCO.^{70,81}

A região cromossômica 9p21 tem sido amplamente estudada, através das mais variadas metodologias moleculares, em diversas neoplasias.^{64,78,106} Um gene que reside nesse local e possui grande relevância para a carcinogênese é o gene supressor tumoral *CDKN2A*. Este codifica a proteína p16 (inibidor de CDKs) que impede a formação do complexo cinase/ciclina D1 essencial para a progressão do ciclo celular. Desta forma a expressão de *CDKN2A* funciona como regulador negativo do ciclo celular, impedindo a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.² Diversos estudos demonstram a frequente presença de inativação da região 9p21 em carcinomas, sendo demonstrado deleção, metilação ou perda homozigótica do gene *CDKN2A* em amostras de CPCCO.^{2,70,76,107}

Deste modo as alterações com maior relevância para o CPCCO são a amplificação da região 11q13, onde reside o gene *CCND1*, a inativação de *CDKN2A*, por deleção ou metilação e a mutação do gene *TP53*.

O estudo dos mecanismos genéticos e epigenéticos associados ao desenvolvimento da carcinogênese oral pode contribuir para o aparecimento de novas bases moleculares, permitindo o estabelecimento da correlação entre o genoma e as características histopatológicas do tumor. O conhecimento aprofundado das alterações ocorridas nas diversas neoplasias permitiria o melhoramento do diagnóstico e prognóstico da doença assim como o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

8. TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DO CARCINOMA DA CAVIDADE ORAL

O desenvolvimento tecnológico e o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de carcinogênese tornam possível a realização de estudos mais aprofundados, nomeadamente estudos genéticos, obtendo desta forma informação mais detalhada acerca de diversas doenças malignas. O estudo da composição genética das células cancerígenas permite maior compreensão das vias de sinalização moleculares envolvidas nos processos associados à oncogênese bem como contribui para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O estudo molecular de neoplasias como o CPCCO tem sido cada vez mais abordado, devido à elevada incidência e mortalidade atribuída a esta patologia.

A caracterização do genoma pode ser realizada utilizando diversas técnicas moleculares, permitindo a determinação de alterações no número de cópias de sequências cromossômicas em diversos carcinomas. Algumas dessas técnicas incluem o

estudo por citogenética convencional (cariótipo), FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization), ensaios de perda de heterozigotia (LOH), Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) e array-Comparative Genomic Hybridization (aCGH). A disponibilidade de diversas metodologias para a determinação das alterações no número de cópias permite selecionar a tecnologia mais adequada para a estratégia pretendida em cada estudo.^{108,109} Neste trabalho foi utilizada a técnica MS-MLPA para a avaliação do perfil genético e epigenético de pacientes com diagnóstico de CPCCO. Esta representa uma técnica sensível, fiável e economicamente viável para a análise das alterações no número de cópias e do padrão de metilação de genes específicos.

8.1. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

O MLPA é uma técnica utilizada extensivamente na identificação de genes relevantes em diversas doenças genéticas humanas, sobretudo neoplasias. Este método tem sido eficiente na identificação das alterações genéticas ocorridas, nomeadamente amplificações e deleções em genes com predisposição para o cancro humano.^{64,109,110}

A metodologia da técnica de MLPA foi descrita pela primeira vez em 2002 por Schouten e colaboradores¹⁰⁸ e corresponde a um método de biologia molecular semi-quantitativo que permite detetar alterações no número de cópias de DNA em comparação com amostras controlo.

O MLPA possui como vantagens o processamento de um grande número de amostras e a quantificação de múltiplas sequências em simultâneo, elevada sensibilidade, uma vez que as reações requerem no mínimo 20 ng de DNA (aproximadamente 3000 células), representa um processo simples e rápido de efetuar, sendo possível a obtenção de resultados 24 horas após extração de DNA da amostra. Contudo as limitações desta técnica consistem na elevada sensibilidade a contaminantes e inibidores da reação de PCR, incapacidade de detetar alterações de ploidia e mosaicismo de baixa expressão e obtenção de falsos positivos devido à ineficiência de hibridização das sondas provocado por mutações pontuais ou SNPs que se encontram perto do seu local de ligação.^{108,111,112}

A robustez desta técnica depende inteiramente do método de extração de DNA utilizado, sendo necessário utilizar a mesma metodologia de extração nas amostras controlo.

8.1.1 MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

O conhecimento do padrão de metilação genético é essencial no estudo da expressão de genes tanto em situações normais como patológicas, uma vez que a presença de metilação em genes supressores tumorais específicos pode levar à modificação da sua função com consequente alteração do controlo do ciclo celular.⁶⁴

A técnica MS-MLPA, descrita por Nygren e colaboradores¹¹³ em 2005, corresponde a uma variante da técnica convencional de MLPA apresentando o princípio de funcionamento semelhante. A realização da metodologia de MS-MLPA permite não só detetar as alterações no número de cópias de determinados genes como também o nível de metilação desses mesmos genes.

As etapas fundamentais da técnica de MS-MLPA são **i)** Desnaturação de DNA e hibridização das sondas, **ii)** Reação de ligação/Digestão pela *HhaI*, **iii)** Reação de PCR, **iv)** Separação dos fragmentos amplificados e análise dos resultados (Figura 13).

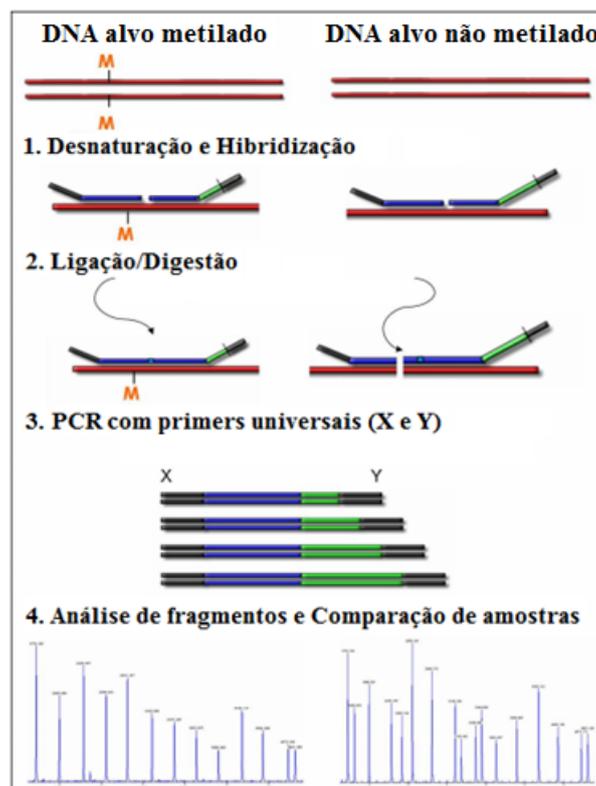


Figura 13 - Representação esquemática das etapas da técnica Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, com e sem a clivagem pela enzima de restrição. **M** indica o grupo metilo (CH₃); **PCR** significa Polimerase Chain Reaction. Adaptado de MRC-Holland.¹¹¹

A deteção de alterações no número de cópias e do padrão de metilação é realizado através de sondas específicas para cada gene. Cada sonda é constituída por duas hemisondas de oligonucleótidos, uma sintética e outra derivada do bacteriófago M13. Cada

hemi-sonda possui numa das extremidades uma sequência de *primer* universal e uma das hemi-sondas possui uma sequência *stuffer*, que apresenta para cada gene um tamanho diferente, sendo possível a obtenção de produtos de PCR com tamanhos diferentes e únicos.¹¹⁴

A metodologia desta técnica é bastante semelhante à técnica de MLPA, com a exceção de que cada reação de MS-MLPA origina duas amostras para cada caso, uma amostra não digerida para a detecção do número de cópias e outra amostra digerida, por ação da endonuclease *HhaI* sensível à metilação, para detecção do padrão de metilação.

Inicialmente é realizada a desnaturação do DNA-alvo com posterior hibridização das hemi-sondas na sequência de DNA específica. As amostras são posteriormente duplicadas, sendo adicionado, às amostras utilizadas para a detecção de alterações no número de cópias, ligase termoestável que liga as hemi-sondas e às amostras utilizadas para a detecção do padrão de metilação é adicionada ligase termoestável e endonuclease *HhaI*. A enzima de restrição *HhaI* atua especificamente na sequência nucleotídica GCGC, que corresponde ao local de ligação do grupo metilo (CH₃). Esta endonuclease apenas cliva as sondas que não se encontram metiladas, permitindo a amplificação das sondas metiladas. É posteriormente adicionada polimerase para o início da reação de PCR que promove a amplificação das sondas hibridizadas utilizando apenas um par de *primers* universais.¹¹⁵ Os produtos amplificados (130-490 nucleóticos) são posteriormente separados por eletroforese capilar e analisados com auxílio de *softwares* computacionais. A análise do perfil de metilação das amostras não necessita da utilização de amostras de tecido controlo, uma vez que os resultados são obtidos comparando a amostra não digerida com a amostra digerida pela *HhaI* correspondente.^{113,116}

O painel de sondas necessário para a realização desta técnica é solicitado à empresa MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) que dispõe de diversos painéis especializados para diversas doenças genéticas. Contudo, atualmente não existe nenhum painel de sondas específico para a detecção do número de cópias e do perfil de metilação do carcinoma da cavidade oral pavimento-celular, estando de momento a ser realizadas investigações nesse sentido entre a empresa e o nosso laboratório.

9. AMOSTRAS

A análise molecular em amostras de tecido tumoral pode ser realizada utilizando diversos materiais como ponto de partida. Na atualidade é prática comum o armazenamento de amostras tumorais em bancos de tecidos nos Laboratórios de Anatomia Patológica, permitindo a preservação da amostra de tecido por longos períodos de tempo. O condicionamento de amostras tumorais pode ser realizado por criopreservação do tecido (-80°C e a -180°C) ou efetuado através da fixação deste com formaldeído e posterior inclusão em blocos de parafina, sendo normalmente utilizado uma solução fixadora de 10% de formaldeído.¹¹⁷ O armazenamento por longos períodos de tempo de amostras de tecido em parafina promove a formação de metanol e ácido fórmico a partir do formaldeído utilizado como fixador. O ácido fórmico induz a formação de quebras nas sequências de DNA, sendo comum a obtenção de DNA degradado e não viável para amplificação pela reação de PCR.^{118,119} Apesar das desvantagens, a utilização deste material tem vindo a despertar crescente interesse na comunidade científica devido à elevada quantidade e variedade de amostras armazenadas em parafina e devidamente caracterizadas histologicamente, tornando deste modo interessante a sua utilização para estudos moleculares. Para a caracterização genética destas amostras, com recurso a metodologias mais exigentes do ponto de vista da qualidade de DNA, é necessário a otimização dos métodos de extração de DNA a partir de amostras de tecido parafinizado.

A análise do perfil molecular pode ser também realizada em amostras provenientes de diversos fluídos biológicos. A saliva corresponde a uma secreção aquosa da cavidade oral que apresenta células vivas e mortas, DNA, RNA e outros metabolitos,⁷⁰ permitido desta forma identificar anomalias moleculares em amostras de indivíduos com lesões potencialmente malignas ou CPCCO. Biofluídos como o plasma sanguíneo e a urina são também utilizados na análise molecular de diversas neoplasias, nomeadamente o cancro oral. Apesar da recolha de sangue representar um método mais invasivo, a deteção de antígenos específicos presentes no sangue permite a obtenção de informação crucial para a deteção de lesões potencialmente malignas.⁷⁰

10. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal a análise genética e epigenética de 30 pacientes com diagnóstico de CPCCO através da técnica MS-MLPA. O conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na progressão da carcinogénese oral contribui para o desenvolvimento de diagnósticos com base molecular e específicos para cada indivíduo, facilitando a escolha de uma estratégia clínica e um tratamento mais adequado, contribuindo assim para um prognóstico mais favorável. Contudo escassos avanços foram realizados no conhecimento detalhado ao nível dos genes envolvidos no desenvolvimento e progressão do tumor, assim como a correlação entre as alterações moleculares já conhecidas e as características histopatológicas do CPCCO.

Após a análise epigenética por MS-MLPA de tecido tumoral fresco é pretendido estabelecer uma adequada relação entre o genótipo e o fenótipo da doença assim como estabelecer um padrão de metilação associado ao cancro oral. A tecnologia de MS-MLPA representa uma metodologia sensível, eficiente e economicamente viável para a sua futura utilização no diagnóstico precoce e *follow-up* de pacientes com diagnóstico de cancro oral.

É pretendido simultaneamente a análise genética e epigenética de tecido tumoral incluído em parafina dos mesmos pacientes que foram submetidos à análise de tecido tumoral fresco.

Pretende-se também com este estudo a comparação dos resultados genéticos e epigenéticos das amostras de tecido tumoral fresco com as amostras de tecido tumoral incluído em parafina, de forma a validar este material para estudos retrospectivos. Diversos estudos indicam que a análise genética de amostras parafinizadas possui algumas desvantagens, uma vez que se verifica a obtenção de DNA degradado para a sua utilização na reação de PCR.^{118,119} Contudo com a utilização de métodos de extração de DNA eficientes e específicos para tecidos parafinizados é possível obter DNA em quantidade e qualidade suficiente para a análise pela técnica de MS-MLPA.¹²⁰ A validação das amostras parafinizadas para estudos genéticos e epigenéticos, possibilitaria, face ao elevado manancial de amostras parafinizadas armazenadas nos diversos laboratórios de anatomia patológica, a análise de uma grande quantidade de amostras tumorais bem caracterizadas, podendo ser feita a correlação histológica e o perfil molecular.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS

1. PACIENTES E AMOSTRAS

As amostras analisadas neste trabalho correspondem a 30 biópsias de tecido tumoral recolhidas de pacientes com diagnóstico de CPCCO, provenientes das consultas de Cirurgia Maxilofacial e/ou Estomatologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC).

A cada paciente foi removido, na cirurgia, a peça de tecido tumoral que posteriormente é enviada para a Anatomia Patológica para a caracterização histológica do tecido. A colheita das amostras utilizadas neste trabalho corresponde ao excedente das peças enviadas para a Anatomia Patológica, onde são recolhidas simultaneamente amostras em espelho para confirmação histopatológica. As 30 amostras de tecido tumoral fresco foram cedidas ao Laboratório de Citogenética e Genómica (LCG) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) para análise genética, no período compreendido entre Outubro de 2010 e Maio de 2013.¹²⁰

A fixação do tecido tumoral em formaldeído e inclusão deste em parafina foi realizada pelo médico patologista, que após a realização de cortes histológicos do tecido e coloração com hematoxilina e eosina (H&E) observou as características histopatológicas do tecido e confirmou o diagnóstico de CPCCO. Realizaram-se de seguida cortes em série de 10µm da área tecidular tumoral delimitada pelo patologista que foram entregues ao LCG devidamente identificadas. Foram cedidas 30 amostras de tecido tumoral incluído em parafina no período compreendido entre Novembro de 2012 e Junho de 2013, sendo estas amostras referentes aos 30 pacientes previamente submetidos à análise genética de tecido fresco.

A determinação das alterações genéticas pela técnica utilizada exige a comparação das amostras de tecido tumoral com amostras controlo que apresentem o mesmo método de extração de DNA. Deste modo, como amostras controlo foram utilizadas peças de tecido normal fresco proveniente de dez indivíduos saudáveis, que foram sujeitos à extração de sisos inclusos no Serviço de Estomatologia do CHUC. Como controlos para as amostras parafinizadas foram utilizadas três biópsias de tecido normal, que foi posteriormente incluído em parafina, de pacientes que foram submetidos à extração de fibromas de irritação próstética no Serviço de Estomatologia do CHUC.

Juntamente com o processo clínico foram recolhidos os seguintes dados de cada paciente: idade, sexo, estadió do tumor de acordo com o sistema classificativo TNM, hábitos tabágicos e consumo de álcool, assim como a data do diagnóstico anatomopatológico confirmativo da lesão e o tratamento praticado. Todos os procedimentos acima referidos foram realizados após a aprovação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Coimbra e com consentimento informado por escrito de todos os indivíduos envolvidos neste estudo (ver modelo de consentimento informado no Anexo I). Algumas das características clínicas (sexo, idade aquando o diagnóstico, localização anatómica do tumor, estadió tumoral de acordo com o sistema TNM, hábitos tabágicos e tratamento submetido) dos pacientes com diagnóstico de CPCCO analisados neste trabalho encontram-se descritas na tabela IV.

Tabela IV – Características clínicas dos pacientes com carcinoma pavimento-celular da cavidade oral incluídos no estudo. Legenda: ♂ (sexo masculino), ♀ (sexo feminino); CIR (Cirurgia), RT (Radioterapia), QT (Quimioterapia).

Paciente	Sexo	Idade	Local Anatómico	Estadió	Tabaco	Tratamento
1	♂	65	Mucosa jugal	IV	Não	CIR
2	♀	47	Pavimento bucal	I	Sim	CIR+RT
3	♀	75	Pavimento bucal	III	Não	CIR
4	♂	49	Língua	IV	Sim	RT+QT
5	♂	56	Pavimento bucal	I	Sim	CIR
6	♂	74	Pavimento bucal	IV	Sim	RT+QT
7	♂	64	Língua	III	Sim	QT
8	♂	63	Língua	III	Sim	RT+QT
9	♂	69	Pavimento bucal	IV	Sim	CIR
10	♂	54	Língua	II	Sim	RT
11	♂	46	Pavimento bucal	II	Sim	CIR
12	♂	49	Pavimento bucal	IV	Sim	RT
13	♂	78	Pavimento bucal	IV	Sim	RT+QT
14	♂	45	Mucosa jugal	III	Não	RT
15	♂	51	Pavimento bucal	IV	Sim	RT+QT
16	♂	44	Língua	III	Sim	CIR
17	♂	59	Rebordo gengival	IV	Sim	RT+QT
18	♂	37	Pavimento bucal	II	Não	RT+QT
19	♂	75	Língua	II	Não	CIR
20	♂	73	Pavimento bucal	IV	Sim	RT
21	♂	63	Língua	I	Sim	RT
22	♂	78	Pavimento bucal	III	Sim	CIR
23	♀	67	Língua	III	Não	CIR
24	♂	84	Língua	III	Não	CIR
25	♂	59	Língua	II	Sim	CIR
26	♀	77	Língua	IV	Não	CIR+RT
27	♂	56	Trígono retromolar	II	Sim	QT
28	♂	53	Língua	I	Sim	CIR
29	♂	52	Língua	III	Sim	QT
30	♂	80	Mucosa jugal	II	Não	CIR

1. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA do tecido fresco e parafinado foi realizada recorrendo a kits de extração comerciais. A extração de DNA de todas as amostras de tecido fresco foi realizada recorrendo ao kit de extração *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche GmbH, Mannheim, Germany)¹²¹, de acordo com as instruções do fabricante (ver protocolo em detalhe no Anexo II).

Tendo em conta a realização da otimização da metodologia de extração de DNA de amostras de tecido incluído em parafina, realizada no LCG da FMUC¹²⁰, foi utilizado neste trabalho o método *DNA FFPE Tissue Kit* (QIAamp, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)¹²² para a extração de DNA das amostras tumorais e controlo incluídas em parafina. Esta metodologia possui uma fase inicial de desparafinização com xileno e etanol permitindo obter valores de concentração e pureza de DNA de tecido armazenado em parafina dentro dos limites aceitáveis para a análise genética através de técnicas moleculares, em comparação com outros métodos de extração (ver protocolo em detalhe no Anexo III).

2. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS

Após extração de DNA de todas as amostras de tecido foi realizada a quantificação da concentração de DNA e análise da integridade das amostras, utilizando um espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Com a utilização do espectrofotómetro e com o auxílio do seu *software* é possível determinar a concentração e pureza de DNA utilizando apenas 2 µL de amostra. O grau de pureza da amostra é avaliado através do quociente entre a absorvância a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e entre 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}), sendo o DNA considerado puro quando o quociente A_{260}/A_{280} se situa aproximadamente entre 1,7 a 2 e os valores do quociente A_{260}/A_{230} entre 1,8 a 2,2.¹²³

Tendo em conta que o DNA das amostras incluídas em parafina se encontra frequentemente fragmentado, foi realizado o estudo da integridade das amostras analisadas recorrendo à eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com solução de *GreenSave* (Nzytech Lisboa, Portugal). O marcador de peso molecular utilizado foi o *50pb DNA Step Ladder* (Promega, Madison USA). A eletroforese foi realizada a 100v, durante 110 minutos e a imagem obtida com o *Bio-Rad ChemiDoc XRS*, utilizando o *software Quantity One v4.2* (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

3. ANÁLISE POR MS-MLPA

A utilização da técnica de MS-MLPA permite a obtenção da análise das alterações no número de cópias e o padrão de metilação de genes específicos de forma simples, fiável e com custos reduzidos.

O procedimento foi realizado conforme descrito por Nygren e colaboradores¹¹³ sendo que todos os reagentes utilizados na realização desta metodologia foram fornecidos pela empresa MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands), à exceção da enzima de restrição *HhaI* que provém da Promega (Madison, USA). O painel de sondas utilizado para a análise genética e epigenética dos pacientes em estudo foi o *SALSA probemix ME002-C1*¹²⁴, uma vez que possui sondas específicas para diversos genes supressores tumorais importantes na carcinogénese oral. Este painel possui 41 sondas para deteção de alterações no número de cópias de 38 genes supressores tumorais distintos (Figura 14) e 27 sondas para deteção do perfil de metilação de 25 genes diferentes (ver painel de sondas em detalhe no Anexo IV). A presença de várias sondas, distribuídas por quase todo o genoma, assim como a presença de sondas diferentes para a mesma região cromossómica facilita a validação dos resultados permitindo interpretar mais facilmente a alteração molecular detetada.

Foi utilizado inicialmente 5 µL com aproximadamente 80 ng de DNA das amostras de tecido fresco e aproximadamente 150 ng de DNA das amostras de tecido incluído em parafina, de forma a assegurar a presença de DNA suficiente para a análise. Todos os passos da técnica foram executados com auxílio de um termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA). A endonuclease sensível à metilação utilizada para o estudo do perfil epigenético foi a *HhaI* (Promega, Madison, USA). Após a reacção de PCR (durante 35 ciclos), a interpretação dos resultados foi realizada com 0,75 µL de produtos amplificados e 9,4 µL de solução de mistura com *Rox*TM (Applied Biosystems, Foster City, USA) e formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, USA) (ver protocolo em detalhe no Anexo V). A separação das sondas amplificadas por PCR foi realizada num sequenciador genético ABI PRISMTM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA) e posteriormente analisadas com auxílio do *software GeneMapper v4.1* (Applied Biosystems, Foster City, USA) permitindo a identificação e análise visual dos eletroferogramas. O cálculo dos resultados foi realizado posteriormente recorrendo ao *software Coffalyser.Net* (MRC-Holland,

Amsterdam, The Netherlands) que disponibiliza a razão entre as amostras tumorais em análise e as amostras controle.

Neste trabalho foram analisadas 40 amostras de tecido fresco (30 amostras tumorais e 10 amostras controle) e 13 amostras de tecido incluído em parafina (10 amostras tumorais e 3 amostras controle). Os valores para o número de cópias (incluindo o desvio padrão) entre 0,8-1,2 foram interpretados como normal, sendo os valores inferiores a 0,8 considerados como perda do número de cópias de material genético e valores superiores a 1,2 considerados como ganho/amplificação genética. Os valores para o nível de metilação são analisados em intervalos de percentagem de metilação.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa informático Statistical Package for Social Sciences v17.0 (Chicago, USA).

Para a caracterização das amostras de tecido fresco recorreu-se à utilização de medidas descritivas de dispersão e tendência central, como a média e o desvio padrão (variáveis quantitativas) e frequências absolutas e relativas (variáveis nominais).

A avaliação do grau de concordância das amostras de tecido fresco e tecido incluído em parafina foi realizada recorrendo à análise de concordância Kappa. O teste Kappa é uma medida de concordância utilizada em escalas nominais, baseando-se no número de respostas concordantes. Esta medida de concordância tem como valor máximo 1, onde este valor apresenta total concordância e os valores próximos ou abaixo de 0 indicam nenhuma concordância entre as amostras. A interpretação dos valores obtidos no teste Kappa foi realizada segundo os critérios de classificação propostos por Landis e Koch¹²⁵. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula estabelecido foi 0,05, com intervalo de confiança de 95%.

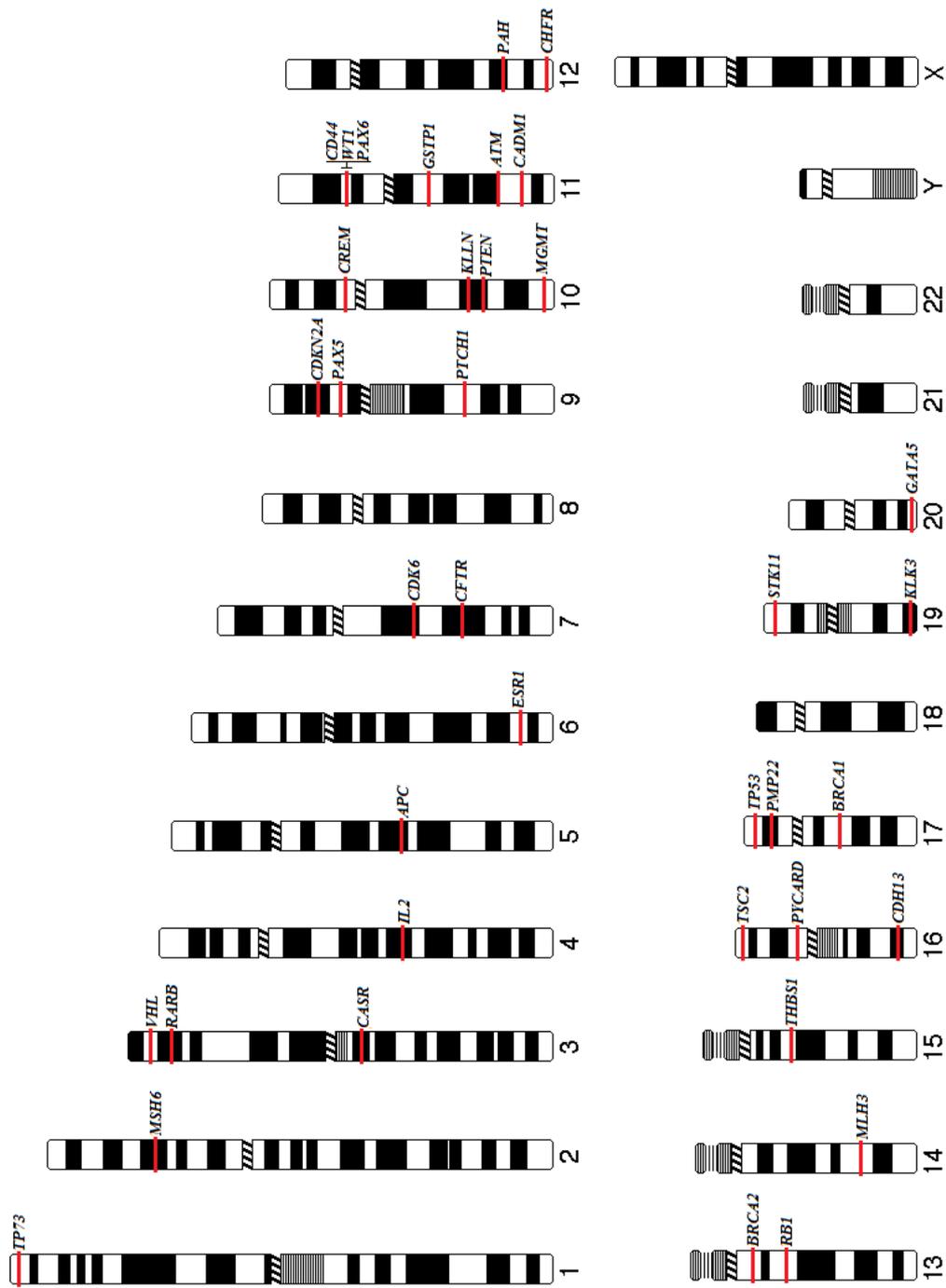


Figura 14 – Representação esquemática de um ideograma com os genes supressores tumorais analisados pela técnica de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas *ME002-C1*. Adaptado de Vincent-Chong et al., 2013.⁷¹

CAPÍTULO III

RESULTADOS

CAPÍTULO III – RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO

No presente estudo foram analisados 30 pacientes com diagnóstico de carcinoma-pavimento celular da cavidade oral, com idade média de 61,4 anos ($\pm 12,8$) (variando dos 37 aos 84 anos). Da população em estudo, 86,7% (26/30) são indivíduos do sexo masculino e apenas 13,3% (4/30) são indivíduos do sexo feminino. Cerca de 70% (21/30) dos pacientes analisados apresentavam hábitos tabágicos na altura do diagnóstico ou foram fumadores durante vários anos. Quanto à localização anatómica do tumor, aproximadamente 43,3% (13/30) dos pacientes apresenta o tumor na língua, 40% (12/30) no pavimento bucal, 10% (3/30) na mucosa jugal, 3,3% (1/30) no triângulo retromolar e 3,3% (1/30) no rebordo gengival (Figura 15).

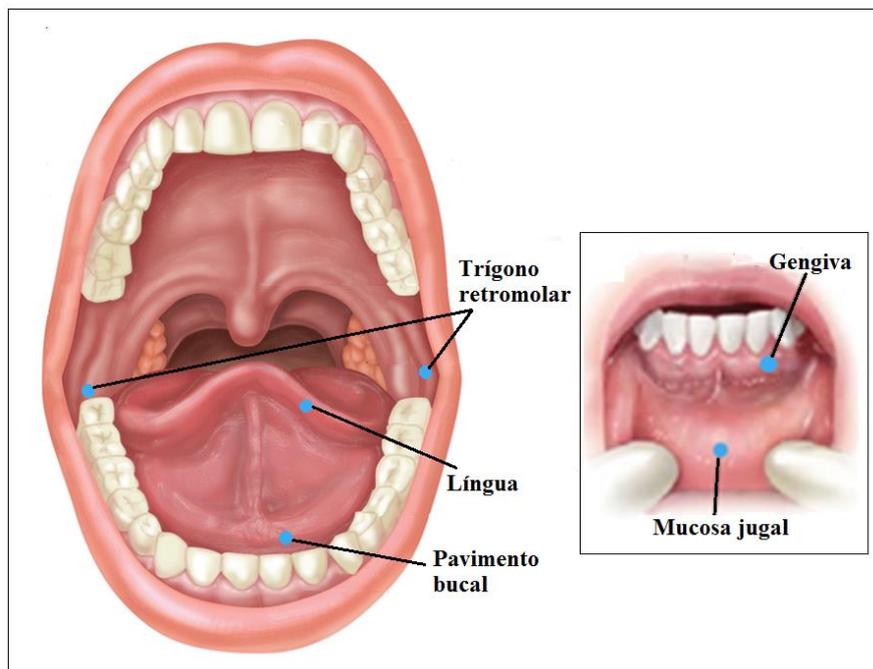


Figura 15 - Representação esquemática dos diferentes locais anatómicos onde se encontram localizados os tumores dos 30 pacientes em estudo

As amostras de tecido fresco normal da cavidade oral utilizadas para controlo provêm de dez indivíduos sem história clínica de neoplasia, seis indivíduos do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com idade média de 33,3 anos ($\pm 13,2$) (variando dos 21 aos 54 anos). As amostras controlo de tecido fresco foram removidas durante a extração de cisos inclusos de indivíduos saudáveis, sendo este exclusivamente tecido gengival. As três amostras de tecido controlo incluído em parafina foram removidas durante a extração de fibromas de irritação prótica de indivíduos saudáveis.

2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

Após a extração de DNA das amostras é possível avaliar a sua quantidade e qualidade com a utilização do espectrofotómetro *NanoDrop*.

A concentração de DNA obtida nas 30 amostras de tecido tumoral fresco apresenta em média valores bastante favoráveis, uma vez que a utilização da técnica de MS-MLPA apenas exige a utilização de 20 ng de DNA. No que diz respeito à qualidade do DNA, as amostras em geral apresentam valores de absorvância a 260/280 e 260/230 dentro dos limites aceitáveis para o DNA puro.

A concentração de DNA das 30 amostras de tecido tumoral incluído em parafina apresentam em geral valores inferiores aos valores obtidos nas amostras de tecido tumoral fresco. No que diz respeito à qualidade do DNA, tanto as amostras tumorais como controlo possuem valores de absorvância mais elevados do que as amostras de tecido fresco, indicando a presença de impurezas nas amostras. Deste modo foram selecionadas dez amostras de tecido tumoral incluído em parafina com valores de concentração e pureza de DNA similares para a realização da análise genética por MS-MLPA.

Para verificar a presença de fragmentação de DNA realizou-se uma eletroforese de gel em agarose para 11 amostras de tecido tumoral parafinizado e 6 amostras de tecido fresco (Figura 16).



Figura 16 - Representação dos resultados obtidos na eletroforese em gel de agarose 2,5%. **Legenda:** MM- marcador de peso molecular; 1- amostra controlo parafina; 2- amostra parafina Paciente 1; 3- amostra parafina Paciente 7; 4- amostra parafina Paciente 9; 5- amostra parafina Paciente 11; 6 - amostra parafina Paciente 12; 7/8- amostra parafina/fresco Paciente 14; 9/10- amostras parafina/fresco Paciente 16; 11/12- amostra parafina/fresco Paciente 25; 13/14- amostras parafina/fresco Paciente 26; 15/16- amostras parafina/fresco Paciente 28; 17- amostra controlo fresco.

Com a realização da eletroforese em gel de agarose, foi possível verificar a presença de DNA não degradado e em quantidade suficiente para a análise por MS-MLPA das amostras de tecido fresco (8, 10, 12, 14, 16 e 17), contudo não foi possível verificar a presença de DNA em nenhuma das amostras de tecido parafinizado (1-7, 9, 11, 13 e 15). Deste modo foi realizada nova eletroforese em gel de agarose, apenas para as

amostras parafinizadas, aumentando consideravelmente a concentração de DNA aplicada, constatando-se novamente a ausência de DNA nestas amostras.

3. ANÁLISE POR MS-MLPA

3.1. Resultados obtidos por MS-MLPA em biópsia de tecido tumoral fresco

As amostras de tecido fresco foram analisadas, através da técnica MS-MLPA, com o auxílio do *software GeneMapper* que permite a identificação e visualização dos picos referentes a cada fragmento de DNA.

Na análise do eletroferograma referente a uma amostra de tecido controle, do sexo feminino, (Figura 17) é possível verificar a presença de metilação do promotor do gene *CD44* (eletroferograma 2).

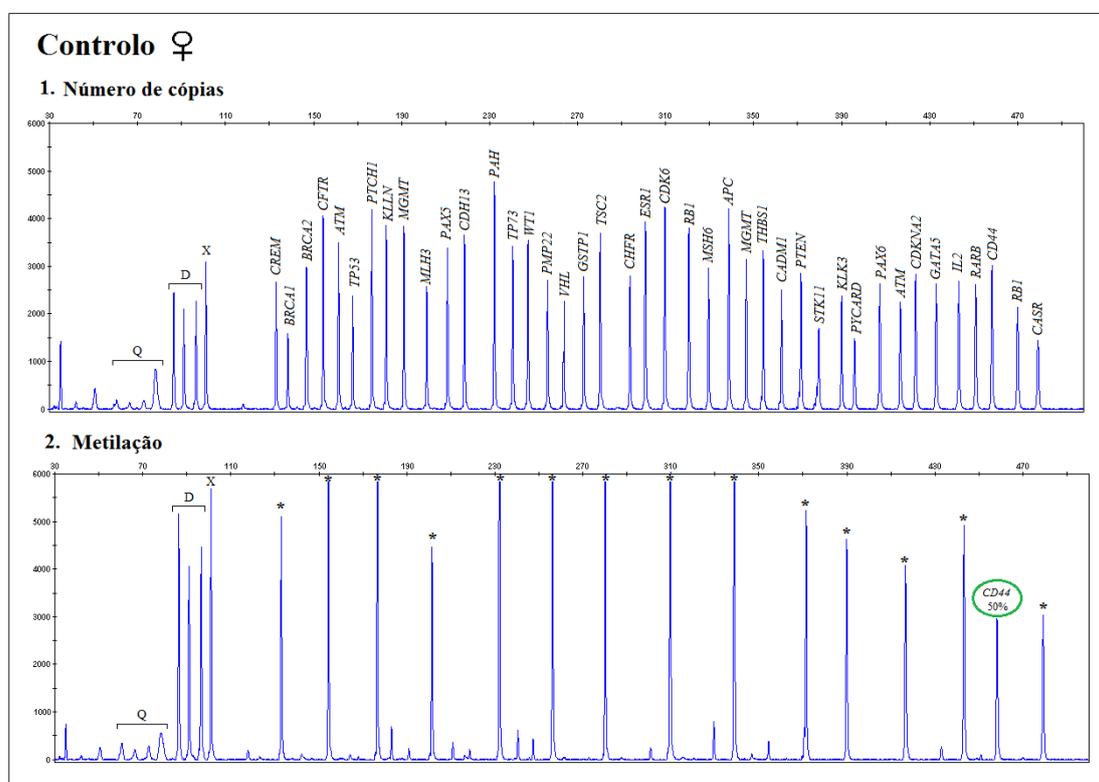


Figura 17 – Eletroferograma representativo de uma reação de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas *ME002*. Os eletroferogramas apresentados correspondem a um controle feminino (1,2). As sondas representadas com * no eletroferograma 2 indicam as sondas sem local de restrição para a enzima *HhaI*.

Os resultados de MS-MLPA originam para cada amostra dois eletroferogramas, um para a análise do número de cópias e o outro para análise do perfil de metilação, cujas amostras foram submetidas à digestão pela enzima *HhaI*. Na análise do eletroferograma é possível verificar determinados parâmetros que funcionam como controle da experiência. A quantidade de DNA da amostra é verificada nos primeiros quatro picos (fragmentos-Q) do eletroferograma, observando-se picos de pequeno tamanho ou até

invisíveis quando a presença de DNA é suficiente para a análise. A desnaturação do DNA é verificada nos picos relativos a fragmentos de DNA com 88, 92 e 96 nucleótidos (fragmentos-D), ricos em ilhas CpG e deste modo de difícil desnaturação. O painel de sondas possui também fragmentos de DNA que hibridizam com regiões do cromossoma X (100 nt) e do cromossoma Y (105 nt).

Na análise do eletroferograma referente ao paciente 5 (Figura 18) verifica-se aumento dos picos relativos aos genes *BRCA1*, *CDH13*, *TP73*, *GSTP1*, *CDK6*, *KLK3*, *PYCARD* e *CASR* (eletroferograma 3) em relação às amostras controlo, indicando ganho de material genético e diminuição da altura dos picos relativos aos genes *PTEN* e *CDKN2A*, indicando perda genética. Na análise do perfil de metilação do paciente 5 (eletroferograma 4) verifica-se metilação do gene *CD44* e hipermetilação do gene *WT1*.

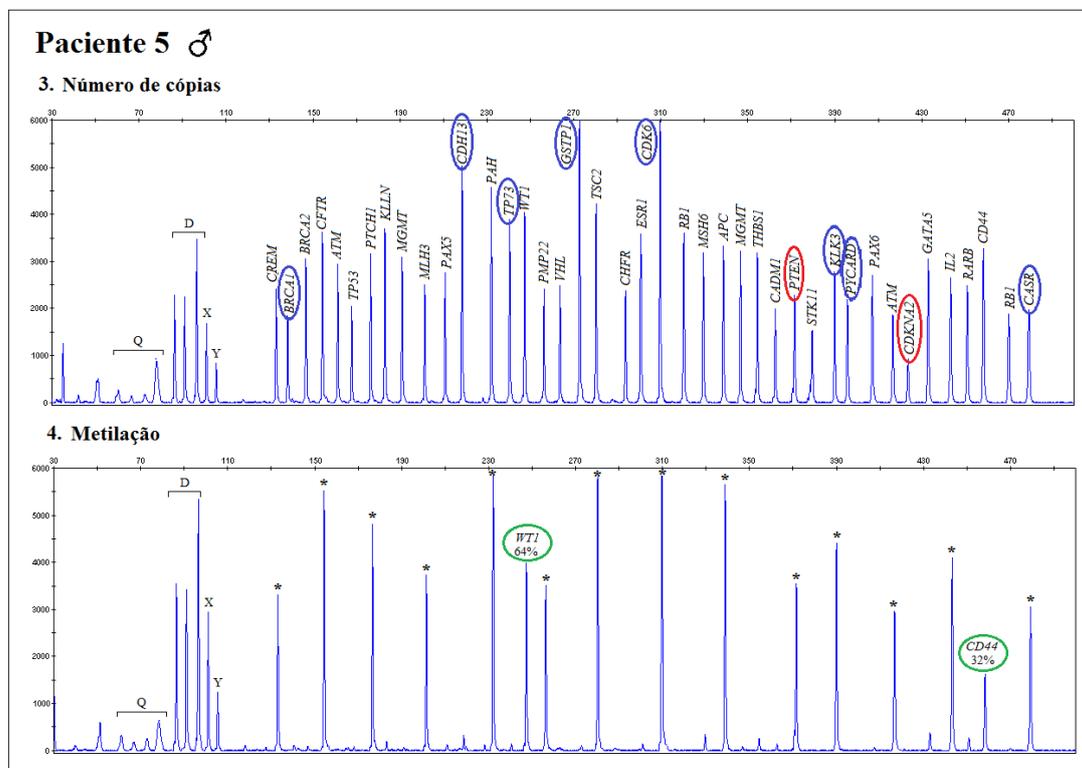


Figura 18 - Eletroferograma representativo de uma reação de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas *ME002*. Os eletroferogramas apresentados correspondem ao paciente 5, do sexo masculino (3,4). As sondas representadas com * no eletroferograma 4 indicam as sondas sem local de restrição para a enzima *HhaI*.

3.1.1. Alterações no número de cópias

A análise genética das dez amostras controlo, provenientes de indivíduos saudáveis que foram submetidos à extração de cistos inclusos, permitiu verificar que nenhum dos indivíduos possui alterações significativas no número de cópias dos 38 genes supressores tumorais estudados.

Após a análise das amostras de tecido tumoral, através da técnica MS-MLPA, verificou-se a presença de alterações no número de cópias de um ou vários genes em 93,3% (28/30) dos pacientes analisados. Dois dos pacientes analisados com diagnóstico de cancro oral (Paciente 6 e 28) não apresentaram alteração em nenhuma região cromossômica analisada por MS-MLPA com o painel de sondas *ME002* (Tabela V). Foi possível identificar alterações no número de cópias em 37 genes supressores tumorais presentes no painel de sondas utilizado, com a exceção do gene *THBS1* que não apresenta alteração em nenhum dos 30 pacientes analisados.

No total foram identificadas 204 alterações genéticas, das quais 136 são ganhos e 68 são perdas no número de cópias de material genético (Tabela V).

O gene supressor tumoral *GSTP1* (11q13) apresentou ganho no número de cópias em 60% (18/30) dos pacientes analisados. O segundo gene frequentemente alterado na população em estudo foi o *BRCA1* (17q21), onde foi detetado ganho de material genético em 50% (15/30) dos pacientes e deleção em apenas um paciente (3,3%). O gene *CDKN2A* (9p21) encontra-se alterado em 40% dos pacientes analisados, verificando-se ganho de material genético em 10% (3/30) e perda em 30% (9/30), onde um dos pacientes apresenta deleção homozigótica deste gene. O gene *PYCARD* (16p11.2) apresenta exclusivamente ganho de material genético em 36,7% (11/30) dos pacientes. O gene *MLH3* (14q24.3) apresenta ganho em 30% dos pacientes (9/30) e perda em 6,7% (2/30). O gene *GATA5* (20q13.33) apresenta ganho em 23,3% (7/30) dos pacientes e deleção em 10% (3/30). Os genes *CASR* (3q13) e *TP53* (17p13.1) possuem exclusivamente ganho no número de cópias em 30% (9/30) e 26,7% (8/30) respetivamente (Figura 19).

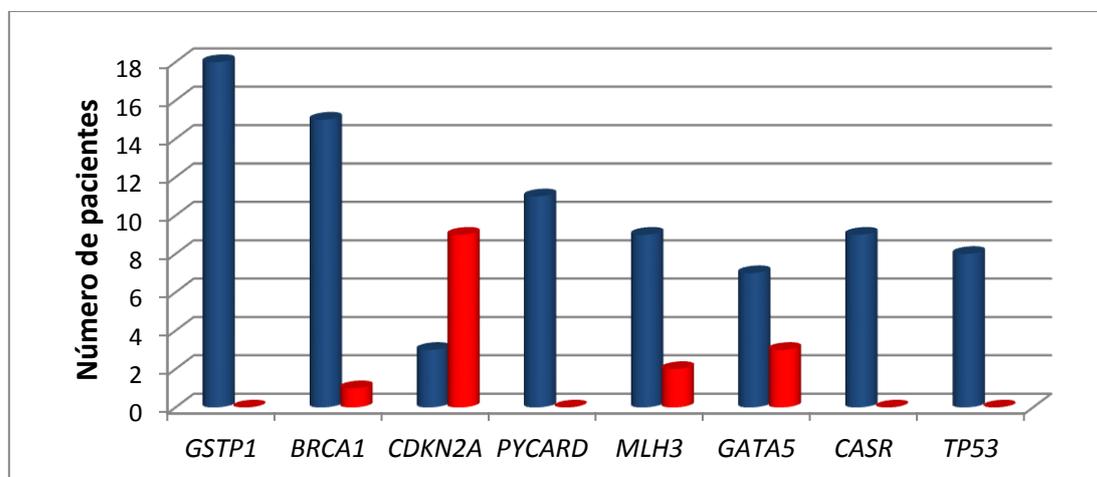


Figura 19 – Gráfico representativo dos genes com maior número de ganhos e perdas no material genético nas 30 amostras de tecido tumoral fresco analisadas. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.

O gene *KLK3* (19q13) apresenta ganho no número de cópias em 23,3% (7/30) e deleção em 3,3% (1/30). Os genes *MSH6* (2p16) e *CDK6* (7q21.2) apresentam exclusivamente ganho de material genético em 20% (6/30) dos pacientes analisados. Apesar de menos frequente, verifica-se alteração no número de cópias dos genes *TP73* (1p36.3), *RARB* (3p24.2), *CFTR* (7q31.2), *WT1* (11p13), *ATM* (11q22.3) e *RBI* (13q14.2) em 16,7% (5/30) da população em estudo.

Adicionalmente os genes *VHL* (3p25.3), *IL2* (4q27), *PTCH1* (9q22.3), *KLLN* (10q23), *PAX6* (11p13), *CADMI* (11q23), *CDH13* (16q23.3) e *STK11* (19p13.3) encontram-se alterados em 13,3% (4/30) dos pacientes. Os genes *APC* (5q22.2), *PAX5* (9p13), *PTEN* (10q23.3), *CD44* (11p13) e *CHFR* (12q24.33) apresentam alterações em 10% (3/30) dos pacientes analisados. Os genes *ESR1* (6q25.1) e *MGMT* (10q26) apresentam exclusivamente perda genética, enquanto os genes *CREM* (10p11.21) e *TSC2* (16p13.3) apresentam exclusivamente ganho genético em 6,7% (2/30) dos pacientes. Os genes *PAH* (12q23.2), *BRCA2* (13q13.1), *PMP22* (17p12) apresentam exclusivamente perda no material genético em apenas 3,3% (1/30) dos pacientes.

A tabela V apresenta, de forma esquemática, todos os resultados obtidos na análise do número de cópias das amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes com diagnóstico de CPMCO (ver valores de número de cópias no anexo VI).

Tabela V – Resultados obtidos das alterações no número de cópias das amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes envolvidos no estudo, utilizando o painel de sondas ME002. **Legenda:** ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.

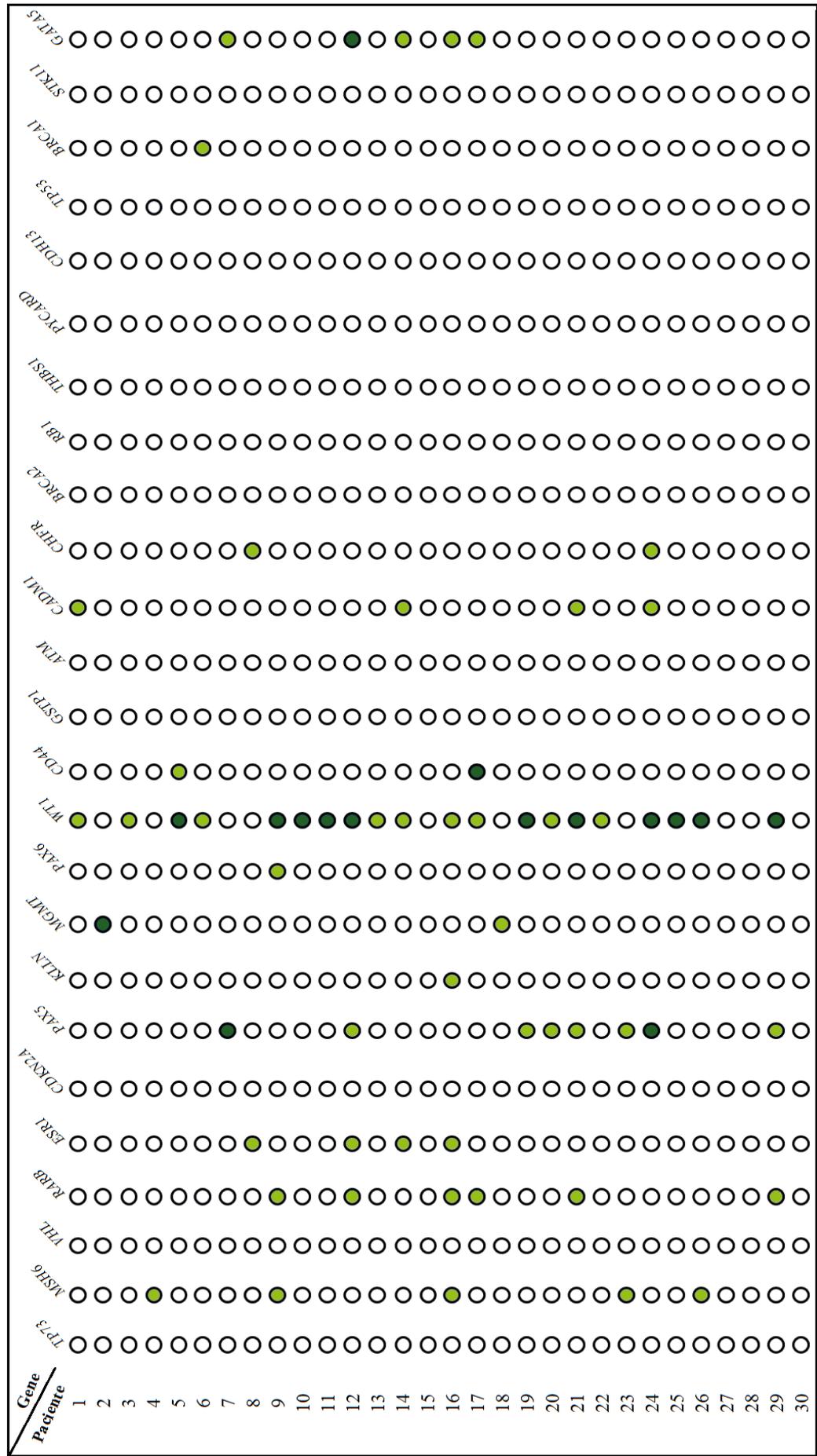
Região	Gene	Pacientes																														Alterações [n° casos (%)]		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Normal	Ganho	Perda
1p36.3	TP73		■			■		■	■																					■	25 (83,3)	3 (10)	2 (6,6)	
2p16	MSH6		■				■	■	■	■																				■	24 (80)	6 (20)	0	
3p25.3	VHL				■								■	■				■								■					26 (86,6)	3 (10)	1 (3,3)	
3p24.2	RARB		■								■	■	■																	■	25 (83,3)	0	5 (16,6)	
3q21.1	CASR		■			■		■		■		■										■	■				■		■	21 (70)	9 (30)	0		
4q27	IL2	■					■										■							■							26 (86,6)	0	4 (13,3)	
5q22.2	APC		■				■															■									27 (90)	0	3 (10)	
6q25.1	ESR1						■										■														28 (93,3)	0	2 (6,6)	
7q21.2	CDK6		■			■		■		■		■																■			24 (80)	6 (20)	0	
7q31.2	CFTR		■				■				■		■						■												25 (83,3)	4 (13,3)	1 (3,3)	
9p21	CDKN2A	■	■			■		■	■	■	■		■			■	■					■				■		■	■		18 (60)	3 (10)	9 (30)	
9p13	PAX5		■					■									■														27 (90)	2 (6,6)	1 (3,3)	
9q22.3	PTCH1																■						■				■		■		26 (86,6)	4 (13,3)	0	
10p11.21	CREM							■																					■		28 (93,3)	2 (6,6)	0	
10q23	KLLN			■					■					■																■	26 (86,6)	2 (6,6)	2 (6,6)	
10q23.3	PTEN	■				■																									27 (90)	0	3 (10)	
10q26	MGMT	■	■																												28 (93,3)	0	2 (6,6)	
11p13	PAX6		■					■	■																						26 (86,6)	0	4 (13,3)	
11p13	WT1	■	■					■	■																						25 (83,3)	1 (3,3)	4 (13,3)	
11p13	CD44		■					■	■														■								28 (93,3)	0	2 (6,6)	
11q13	GSTP1	■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■	■	■		■			■	■	■	■	■	■	■	■	■		12 (40)	18 (60)	0	
11q22.3	ATM	ex 1											■				■														28 (93,3)	0	2 (6,6)	
	ATM	ex 26	■										■		■							■									25 (83,3)	1 (3,3)	4 (13,3)	
11q23	CADM1	■											■	■			■												■		26 (86,6)	0	4 (13,3)	
12q23.2	PAH						■																								29 (96,6)	0	1 (3,3)	
12q24.33	CHFR																	■							■	■					27 (90)	3 (10)	0	
13q13.1	BRCA2													■	■																29 (96,6)	0	1 (3,3)	
13q14.2	RB1		■		■							■	■									■									25 (83,3)	3 (10)	2 (6,6)	
14q24.3	MLH3		■		■		■	■				■			■			■				■	■	■	■	■	■	■	■		19 (63,3)	9 (30)	2 (6,6)	
15q14	THBS1																														30 (100)	0	0	
16p13.3	TSC2						■																						■		28 (93,3)	2 (6,6)	0	
16p11.2	PYCARD			■	■	■		■	■				■		■							■				■					19 (63,3)	11 (36,6)	0	
16q23.3	CDH13					■		■		■		■																	■		26 (86,6)	3 (10)	1 (3,3)	
17p13.1	TP53		■	■			■	■	■								■		■				■								22 (73,3)	8 (26,6)	0	
17p12	PMP22											■																			29 (96,6)	0	1 (3,3)	
17p21	BRCA1	■	■			■		■	■	■	■	■		■		■			■				■		■		■				14 (46,6)	15 (50)	1 (3,3)	
19p13.3	STK11			■			■	■																							26 (86,6)	4 (13,3)	0	
19q13	KLK3		■	■		■		■	■			■			■		■														22 (73,3)	7 (23,3)	1 (3,3)	
20q13.33	GATA5	■		■			■	■		■				■						■				■		■	■	■			20 (66,6)	7 (23,3)	3 (10)	

3.1.2. Alterações no padrão de metilação

Após a análise da percentagem de metilação dos genes supressores tumorais por MS-MLPA da população controlo, foram estabelecidos intervalos de percentagem de metilação. Desta forma considera-se metilado um gene que apresente uma percentagem de metilação entre 25-50% e hipermetilado se a percentagem de metilação se situar entre 51-100%. Depois de estabelecido este intervalo apenas se verifica a presença de baixos níveis de metilação (aproximadamente 34%) do gene *MSH6* em dois dos dez indivíduos saudáveis e baixa hipermetilação (aproximadamente 51%) do gene *CD44* em dois dos dez indivíduos.

A análise das amostras de tecido tumoral fresco através da técnica MS-MLPA permitiu identificar alterações no padrão de metilação em 86,7% (26/30) dos pacientes em estudo. Em 13 dos 25 genes supressores tumorais incluídos no estudo verificou-se alteração no padrão de metilação. O promotor dos genes *TP73*, *VHL*, *CDKN2A*, *GSTP1*, *ATM*, *BRCA2*, *RBI*, *THBS1*, *PYCARD*, *CDH13*, *TP53* e *STK11* não apresentou metilação em nenhum dos 30 pacientes. O gene supressor tumoral *WT1* apresentou alterações no perfil de metilação em 66,7% (20/30) dos pacientes analisados, verificando-se metilação em nove pacientes e hipermetilação em onze pacientes. O promotor do gene *PAX5* encontra-se metilado em seis pacientes (20%) e hipermetilado em dois pacientes (6,7%). Outra alteração frequentemente encontrada na população em estudo foi a metilação do promotor do gene *RARB* que se encontra metilado em 20% (6/30) dos pacientes. O promotor do gene *MSH6* apresenta metilação em 16,7% (5/30) dos casos, demonstrando uma percentagem de metilação de aproximadamente 40% em três pacientes. O promotor dos genes *GATA5*, *ESR1* e *CADMI* apresenta metilação em quatro pacientes, encontrando-se o promotor de *GATA5* hipermetilado num paciente. As restantes alterações no perfil de metilação da população em estudo encontram-se esquematizadas na tabela VI (ver valores de percentagem de metilação no anexo VII).

Tabela VI – Resultados obtidos do padrão de metilação de 25 genes supressores tumorais, de amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes envolvidos no estudo, utilizando o painel de sondas ME002. **Legenda:** O - genes que não se encontram metilados (metilação < 25%); ● - genes metilados (25-50%); ● - genes hipermetilados (51-100%)



3.2. Comparação dos resultados obtidos por MS-MLPA entre biópsia de tecido tumoral fresco e tecido tumoral incluído em parafina

Para a determinação das alterações no número de cópias das amostras de tecido tumoral incluído em parafina é necessário a comparação destas com amostras controle que possuam a mesma metodologia de extração de DNA. Desta forma são utilizadas amostras controle de tecido parafinado de indivíduos sem história clínica de neoplasia mas com diagnóstico de fibroma de irritação prostética. A análise através de MS-MLPA das três amostras controle incluídas em parafina demonstraram a presença de alterações no número de cópias na maioria dos genes, não sendo possível determinar as alterações genéticas das amostras tumorais. Assim, para as amostras tumorais incluídas em parafina apenas foram analisadas as alterações no perfil de metilação, uma vez que esta análise não necessita de amostras controle.

A análise por MS-MLPA das amostras tumorais de tecido incluído em parafina foi repetida, no mínimo duas vezes para cada paciente, de forma a ultrapassar as dificuldades sentidas na obtenção de DNA suficiente para a análise. Desta forma foi possível obter eletroferogramas com qualidade para a análise em todas as amostras analisadas.

Dos 25 genes supressores tumorais analisados apenas se verificou metilação nos genes *MSH6*, *RARB*, *ESR1*, *PAX5*, *KLLN*, *PAX6*, *WT1*, *CADMI* e *GATA5* (tabela VII). Os resultados do perfil de metilação das amostras de tecido parafinado foram comparados com as amostras de tecido fresco correspondente, através do cálculo do índice estatístico Kappa (k), sendo utilizadas as amostras de tecido dos pacientes 1, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 25, 26 e 28.

Tabela VII – Comparação dos resultados obtidos no padrão de metilação das amostras de tecido fresco (F) e incluído em parafina (P) de dez pacientes. **Legenda:** ○ - genes não metilados (metilação ≤ 25%); ● - genes metilados (metilação de 26-100%).

Gene Paciente	<i>MSH6</i>		<i>RARB</i>		<i>ESR1</i>		<i>PAX5</i>		<i>KLLN</i>		<i>PAX6</i>		<i>WT1</i>		<i>CADMI</i>		<i>GATA5</i>		
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	
1	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
9	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
11	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
14	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
25	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
26	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
28	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

A interpretação dos valores de Kappa foi realizada segundo os critérios estabelecidos por Landis e Koch¹²⁵. Estes consideram que valores superiores a 0,75 representam excelente concordância, valores entre 0,4-0,75 representam concordância mediana e valores abaixo de 0,4 representam baixa concordância.

Assim, após a análise estatística foi verificada concordância completa para os genes *TP73*, *VHL*, *CDKN2A*, *MGMT*, *PAX6*, *WT1*, *CD44*, *GSTP1*, *ATM*, *CHFR*, *BRCA2*, *RBI*, *THBS1*, *PYCARD*, *CDH13*, *TP53*, *BRCA1* e *STK11*. Adicionalmente os genes *GATA5*, *RARB*, *ESR1*, *PAX5*, *CADM1* e *KLLN* apresentaram concordância mediana, uma vez que os valores de Kappa se encontram compreendidos entre 0,4-0,75. A análise estatística para o gene *MSH6* revelou baixa concordância entre a amostra de tecido fresco e parafinizado.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO DE RESULTADOS

1. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR MS-MLPA

1.1. Discussão dos resultados obtidos por MS-MLPA para o tecido tumoral fresco

Na atualidade tem-se observado um crescente interesse na compreensão do genoma de pacientes com cancro oral, na tentativa de determinar o perfil genómico ou epigenómico, assim como correlacionar estas alterações com as características clínicas dos pacientes. Deste modo, neste trabalho foi pretendido a determinação das alterações genéticas e epigenéticas ocorridas numa população de 30 pacientes com diagnóstico de CPCCO, na tentativa de estabelecer um padrão característico de alterações para esta neoplasia. A determinação do perfil genético e das alterações chave para o desenvolvimento do cancro oral permite a compreensão da doença, possibilitando a longo prazo um diagnóstico preciso e personalizado, assim como o desenvolvimento de terapias moleculares mais eficazes.

Para a determinação das alterações genéticas e epigenéticas da população em estudo, foi extraído DNA de amostras de tecido tumoral fresco e analisados pela técnica de MS-MLPA, utilizando o painel de sondas *ME002-C1*, 30 pacientes com diagnóstico de CPCCO. A técnica de MS-MLPA permite de forma rápida, precisa e fiável a deteção simultânea de alterações no número de cópias e no padrão de metilação de determinados genes em amostras de tecido tumoral.

Neste estudo para a análise dos resultados de MS-MLPA foram estabelecidos os valores *cutoff* para a determinação das alterações no número de cópias e do padrão de metilação. Para a análise do número de cópias das amostras tumorais, os resultados derivam da comparação do número de cópias do gene em análise com as amostras controlo, de pacientes saudáveis. Assim, teoricamente um rácio de 1 indica a presença dos dois alelos, 0,5 indica a perda de um alelo e 1,5 indica a presença de um alelo em excesso. É frequentemente utilizado em estudos constitucionais, rácios para a análise do número de cópias de $\leq 0,7$ para perda e $\geq 1,3$ para ganho.^{109,126,127} Contudo a frequente presença de mosaicismo em amostras tumorais dificulta a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que mascara a presença de alterações genéticas menos expressivas no genoma. A contaminação com DNA normal reduz a amplitude de variação genética específica do tumor, dificultando deste modo a sua deteção por MS-MLPA.¹²⁸ Jeuken e

colaboradores¹²⁹ demonstram em 2006 que a contaminação com células normais até 50% representa o limite máximo no qual ainda é possível detetar a perda de um alelo por MLPA. Desta forma, os critérios para a alteração no número de cópias definidos neste trabalho foram adaptados, considerando perda se o rácio for $< 0,8$ e ganho se o rácio for $> 1,2$, à semelhança de outros estudos em amostras tumorais.^{129,130} A determinação do intervalo de metilação foi realizada com base na análise da população controlo (dez indivíduos saudáveis), sendo considerado um gene metilado quando a sua percentagem é superior a 25%. Ozdemir e colaboradores¹³¹ em 2012 também estabeleceram o mesmo valor para a metilação na análise de amostras tumorais de cancro de ovário através de MS-MLPA, com o painel de sondas *ME001*. Contudo outros estudos demonstram a presença de alterações no perfil de metilação, através da mesma técnica, em pacientes com cancro da mama, utilizando um valor de metilação de 15%.^{132,133}

Outro aspeto importante na interpretação dos resultados obtidos através da técnica de MS-MLPA é a análise da população controlo. As amostras de tecido normal da população controlo pertencem a dez indivíduos saudáveis, sem história clínica de neoplasia. Foi utilizado tecido gengival dos indivíduos controlo para que este seja similar ao tecido tumoral em análise. Para a análise do número de cópias por MS-MLPA é necessário a presença de pelo menos três amostras controlo para a normalização dos resultados. Contudo a utilização de dez amostras de tecido normal permitiu verificar a semelhança entre estas amostras, tanto no número de cópias como no nível de metilação. Das dez amostras controlo analisadas, foram selecionadas apenas três para a sua efetiva utilização como amostras controlo na análise de todas as reações de MS-MLPA, uma vez que estas não possuem alterações em nenhum dos genes supressores tumorais presentes no painel de sondas utilizado. Verificou-se a presença de alterações no número de cópias de cinco amostras controlo, contudo estas apresentaram valores no limite estabelecido para este parâmetro.

Nos 30 pacientes em estudo foram detetadas no total 204 alterações genéticas, das quais 136 são ganhos e 68 são perdas no número de cópias de material genético, demonstrando uma diferença significativa entre as amostras controlo e as amostras tumorais. Dos 38 genes supressores tumorais analisados por MS-MLPA, apenas o gene *THBS1* não apresentou alteração em nenhum dos pacientes analisados, o que poderá sugerir que este não possua qualquer efeito no aparecimento e desenvolvimento da carcinogénese oral. Contudo o painel de sondas utilizado possui apenas uma sonda para

este gene. Do mesmo modo, as alterações observadas nos genes *CADM1*, *TP73*, *VHL*, *IL2*, *APC*, *ESR1*, *CDK6*, *CFTR*, *PTCH1*, *CREM*, *PTEN*, *KLLN*, *PTEN*, *MGMT*, *PAX6*, *CD44*, *ATM*, *PAH*, *BRCA2*, *CHFR*, *BRCA2*, *RBI*, *TSC2*, *CDH13*, *PMP22* e *STK11* encontram-se em reduzido número na população em estudo (< 26,7%), sugerindo que estas alterações poderão não ser fundamentais para o aparecimento e desenvolvimento do cancro oral. Deste modo apenas são discutidas neste trabalho as alterações genéticas e epigenéticas mais frequentes da população em estudo.

Foram observadas alterações nos genes *WT1*, *GSTP1* e *BRCA1* em mais de 50% dos pacientes analisados, sugerindo a importância destes genes para a carcinogénese oral. A alteração mais frequentemente observada foi a metilação do promotor do gene *WT1*. Além da metilação deste gene em 20 pacientes, foi observada deleção em quatro pacientes (apresentando um deles metilação do gene) e ganho genético em apenas um paciente que também apresenta metilação deste gene. Deste modo estes resultados parecem ser indicativos da presença de baixa expressão do gene *WT1*. Contudo esta hipótese terá de ser comprovada em futuros trabalhos recorrendo a estudos de expressão e proteómica. Este gene, localizado na região cromossómica 11p13, codifica um factor de transcrição que possui um papel importante no crescimento e diferenciação celular, sendo a sua expressão restrita a tecidos como as gónadas, útero, rins e mesotélio.^{134,135} Brett e colaboradores¹³⁶ demonstram a relação inversa entre os níveis de mRNA de *WT1* e E-caderina (*CDH1*) em células de cancro da próstata, demonstrando o papel crucial deste gene na transição epitélio-mesenquimal durante o desenvolvimento embrionário de tecidos com origem mesotelial. Oji e colaboradores,¹³⁷ através de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*), referem a presença de sobreexpressão de *WT1* em CPMCP. Verificou-se também que o aumento da expressão de *WT1* se encontra relacionado com o aumento da invasão e metastização tumoral, uma vez que a perda de adesão celular corresponde a um evento crítico para a conversão de um fenótipo celular migratório.¹³⁶ Também Hylander e colaboradores¹³⁸ no estudo genético do cancro do ovário referem que o aumento da expressão de *WT1* se encontra associado a tumores com estadio e grau superior. Contudo à semelhança da população em estudo, a presença de hipermetilação na região promotora do gene *WT1* é também referida, em diversos estudos, como um acontecimento comum no cancro oral, mama, colórectal, ovário.¹³⁹⁻¹⁴³ Embora Kaneuchi e colaboradores¹⁴³ referiram que o grau de metilação, com a consequente inativação de *WT1*, pode variar dependendo do local metilado e do tipo de cancro. Sendo a alteração de *WT1* bastante significativa (76,7%) na população

em análise, pode sugerir-se a importância deste gene na carcinogénese oral. Tendo em conta que a sobreexpressão de WT1 se encontra associado a um elevado estadio e grau tumoral, é razoável considerar que a sua expressão pode funcionar como um potencial fator para o prognóstico do CPCCO.¹³⁷

A segunda alteração mais frequente na população foi a presença de ganho genético do gene *GSTP1*, não apresentando alterações no perfil de metilação. Este gene codifica a proteína GSTP1, membro da família Glutathione S-Transferase (GST), que possui um papel fundamental na proteção das células epiteliais contra espécies reativas de oxigénio promovidas pelo stress-oxidativo.¹⁴⁴ Para além do importante papel na destoxificação de diversos agentes carcinogénicos, a família GST possui também a capacidade de regular a função de outras proteínas importantes para a manutenção celular, como proteínas reparadoras de DNA. Deste modo a presença de alterações na atividade da enzima GSTP1 contribui para a desregulação da integridade genómica, possuindo desta forma um papel fundamental na suscetibilidade do cancro.¹⁴⁵ Troy e colaboradores¹⁴⁶ em 2013 referem a relação entre a diminuição da atividade desta enzima e o aumento da resposta à quimioterapia em carcinomas da cabeça e pescoço. Estudos indicam também a diminuição frequente da atividade desta enzima em pacientes com diversas neoplasias, podendo esta diminuição ser atribuída à presença de polimorfismos ou metilação no gene *GSTP1*.^{147,148} Estudos recentes indicam que a presença de hipermetilação no promotor do gene *GSTP1* é uma alteração frequente em estadios iniciais de desenvolvimento de cancro da próstata, podendo este funcionar como biomarcador para a deteção desta neoplasia.^{149,150} Contudo ao contrário do referido anteriormente, neste trabalho a população em estudo possui frequente ganho genético deste gene (60%). Este facto pode dever-se à sua localização cromossómica, uma vez que o gene *GSTP1* se localiza na região 11q13, referida como uma região frequentemente amplificada em diversas neoplasias, incluindo o cancro oral.^{68,70,99} Nesta região cromossómica residem diversos genes com função importante no desenvolvimento da carcinogénese, como *CCND1* e *CTTN*.^{100,151,152}

A terceira alteração mais frequente na população em estudo foi a presença de ganho genético de *BRCA1* em 50% dos pacientes analisados, sendo também observada perda num paciente e metilação do seu promotor noutro paciente. A presença de mutações no gene *BRCA1* é responsável pelo aparecimento de aproximadamente 40-45% dos cancros da mama hereditários.¹⁵³ Este gene, localizado na região cromossómica 17q21, codifica uma proteína com capacidade para interagir com diversos factores de transcrição,

possuindo diversas funções na progressão do ciclo celular, processos de reparação de DNA e apoptose.^{153,154} Em 2006 Deng¹⁵⁵ refere que a perda de função e mutações no gene *BRCA1* resultam em diversos fenótipos, incluindo o retardamento do crescimento, aumento da apoptose, défice na reparação de DNA e na progressão do ciclo celular. À semelhança dos resultados obtidos neste trabalho, estudos demonstram a presença de amplificação do gene *BRCA1*⁹⁷, assim como sobreexpressão da proteína BRCA1¹⁵³ em pacientes com cancro oral. Tendo em conta o papel fundamental deste gene em diversas vias celulares, nomeadamente nos processos de reparação de DNA, pode sugerir-se que a sua amplificação ocorre devido à instabilidade genómica associada à proliferação das células tumorais, de forma a impedir o aparecimento de mais alterações genéticas.⁹⁷

Além dos genes referidos anteriormente, os genes *GATA5* e *CDKN2A* também apresentam alterações genéticas frequentes (> 36,7%) na população em estudo. O gene *GATA5*, localizado na região cromossómica 20q13.33, codifica uma proteína com papel crucial na diferenciação de diversas linhas celulares e no desenvolvimento embrionário.¹⁵⁶ A população em estudo apresenta alteração neste gene em 43,3% dos pacientes, verificando-se ganho de material genético em sete pacientes, perda em três e metilação no promotor de *GATA5* em cinco pacientes. Estudos referem a frequente presença de metilação no promotor de *GATA5*, com conseqüente perda de função do gene, em diversas neoplasias.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Guo e colaboradores¹⁵⁹ referem que a metilação do promotor de *GATA5* promove o silenciamento dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação de células epiteliais. Também Wang e colaboradores¹⁵⁷ sugerem que os elevados níveis de metilação de *GATA5* podem inibir o funcionamento normal dos mecanismos de diferenciação celular, contribuindo desta forma para o desenvolvimento da carcinogénese.

O gene *CDKN2A*, localizado na região 9p21, tem sido extensivamente estudado na análise das alterações genéticas ocorridas nas células neoplásicas. Da população em estudo 40% apresentou alteração neste gene, verificando-se ganho genético em 10% (3/30) e perda em 30% (9/30) dos pacientes analisados. Os resultados obtidos são consistentes com o referido na literatura,^{73,76,107} uma vez que a maioria das alterações observadas corresponde a perda no material genético. É importante referir que um dos pacientes analisados neste trabalho (paciente 2) apresentou deleção homocigótica deste gene. Do mesmo modo Foulkes e colaboradores¹⁶⁰ referem a presença comum de deleção heterocigótica ou homocigótica do gene *CDKN2A* em diversas neoplasias. A presença de metilação no promotor deste gene é também um evento comum em diversas

neoplasias, incluindo o cancro oral¹⁶⁰, contudo a população analisada não apresenta alterações no padrão de metilação deste gene. A inativação deste gene é um evento frequente no cancro oral,¹⁶¹ sendo que a perda de *CDKN2A* resulta na interrupção simultânea das vias Rb e p53, encontrando-se esta alteração associada a um fraco prognóstico.¹⁶²

Os genes *PYCARD*, *PAX5*, *MLH3*, *MSH6*, *CASR*, *TP53*, *RARB* e *KLK3* apresentaram alteração genética e epigenética em 30-36,7% da população analisada. O gene *PYCARD*, localizado na região cromossômica 16p11.2, codifica uma proteína composta por dois domínios (PYD no N-terminal e CARD no C-terminal) com papel fundamental no desenvolvimento de apoptose e inflamação celular.^{163,164} Neste estudo 36,7% dos pacientes demonstraram amplificação deste gene. Estudos demonstram a indução de apoptose celular após a agregação da proteína *PYCARD* na periferia nuclear, com consequente ativação da via de sinalização das caspases.^{163,165,166} Drexler e colaboradores¹⁶⁷ demonstram a presença de interação de *PYCARD* com a proteína p53, sugerindo que esta pode contribuir para a supressão tumoral através do aumento da expressão de p53. A presença de metilação em *PYCARD* é também verificada em diversas neoplasias, nomeadamente no cancro da mama, sugerindo que a inativação deste gene nas células tumorais pode diminuir a apoptose, proporcionando uma forte vantagem para o desenvolvimento tumoral.¹⁶⁵

O gene *PAX5*, localizado na região 9p13, possui um papel importante na regulação da diferenciação celular e desenvolvimento embrionário, especialmente no controlo da identidade e desenvolvimento de células B.^{168,169} A população em estudo apresenta alteração neste gene em 36,7% dos pacientes, verificando-se metilação do promotor de *PAX5* em oito pacientes, amplificação em dois pacientes e perda do material genético num paciente. À semelhança da população em estudo, Palmisano e colaboradores¹⁷⁰ referem que a presença de metilação no promotor deste gene corresponde a um mecanismo frequentemente encontrado em diversos tumores sólidos. Também Gasche e colaboradores¹³⁹ demonstram a presença de metilação neste gene em linhas celulares de CPCCO.

Os genes *MLH3* e *MLH6*, localizados na região cromossômica 14q24.3 e 2p16 respetivamente, encontram-se envolvidos na manutenção da integridade genómica, através do controlo de mecanismos de reparação de DNA. Na população em estudo o gene *MLH3* apresenta alteração no número de cópias em 36,7% dos pacientes, sendo verificado ganho no material genético em nove pacientes e perda em dois pacientes.

Contudo o nível de metilação deste gene não é analisado, uma vez que o painel de sondas utilizado apenas possui uma sonda que hibridiza com a sequência de DNA deste gene que não possui um local susceptível a metilação. O gene *MSH6* apresenta alteração em 33.3% dos pacientes analisados, verificando-se metilação do seu promotor em cinco pacientes e ganho no material genético em seis pacientes (apresentando um destes pacientes metilação do gene). Os genes *MLH3* e *MSH6* possuem um papel importante na correção de deleções ou inserções de nucleótidos na sequência de DNA.^{171,172} A incapacidade de reparação de DNA, promovida pela desregulação de genes reparadores, pode aumentar a taxa de mutação levando à instabilidade genética e aumentando o risco de desenvolvimento tumoral.¹⁷³ Diversos estudos referem a frequente presença de mutação ou metilação de genes reparadores de DNA, como *MLH1*, *MLH2*, *MLH3* e *MSH6*, em amostras de CPCCP.^{65,70,173-175} Deste modo novos estudos devem ser realizados para verificar o nível de metilação destes genes nestes pacientes, uma vez que este representa um evento comum no CPCCO.

O gene *CASR* localiza-se na região cromossômica 3q13 e codifica um recetor sensível a cálcio que se encontra acoplado a proteínas G. O recetor CaSR possui um papel fundamental na regulação dos níveis extracelulares e homeostase de cálcio, encontrando-se também envolvido noutras funções celulares como a proliferação, diferenciação e secreção hormonal.¹⁷⁶ Esta proteína encontra-se expressa nas glândulas paratiroides, rins, cérebro, trato gastrointestinal e tecido ósseo.^{177,178} Neste estudo 30% dos pacientes analisados apresentaram ganho no material genético de *CASR*. À semelhança da população analisada, estudos demonstram a presença de expressão do recetor CaSR em linhas celulares de cancro do colon e a sua relação com o aumento de expressão de E-caderina e diferenciação anormal de células epiteliais.^{179,180}

O gene *TP53*, localizado na região cromossômica 17p13.1, codifica a proteína p53 responsável pela regulação do ciclo celular, apoptose, senescência e diferenciação celular.¹ Diversos estudos demonstram a frequente presença de deleção/mutação deste gene tanto no CPCCP^{66,181} como no cancro oral.^{101,105} Também Sano e colaboradores¹⁰² referem em 2011, que a mutação em *TP53* é um evento frequente sendo este considerado um potencial biomarcador para a deteção desta neoplasia. No presente estudo foi detetado ganho no material genético deste gene em 26,7% dos pacientes analisados, sugerindo a possível presença de sobreexpressão da proteína p53, uma vez que não foram encontradas alterações no nível de metilação deste gene. Contudo futuros estudos devem ser realizados para determinar a expressão desta proteína nestes

pacientes, uma vez que neste estudo apenas é avaliado o nível de metilação presente num único local susceptível a esta alteração epigenética. Embora menos frequente, alguns estudos referem a presença de sobreexpressão da proteína p53 em células neoplásicas.^{104,182,183} Em 2011, Szanyi e colaboradores¹⁰⁴ referem a presença de sobreexpressão de p53 em pacientes com CPCCP antes do tratamento, verificando-se a diminuição da expressão desta proteína após o tratamento.

Para ultrapassar as dificuldades sentidas na observação das alterações menos relevantes na população analisada seria importante aumentar o número de amostras tumorais, assim como aumentar o número de amostras controlo no sentido a determinar com maior fidelidade a relação das alterações nestes genes com o desenvolvimento e progressão da carcinogénese oral. O conhecimento dos mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos na progressão da carcinogénese oral contribui para o desenvolvimento de diagnósticos com base molecular e específicos para cada indivíduo, facilitando a escolha de um tratamento mais adequado e contribuindo para o melhoramento dos métodos de diagnóstico e prognóstico.

1.2. Discussão da comparação dos resultados obtidos por MS-MLPA entre o tecido tumoral fresco e parafinizado

Existe na atualidade grande interesse na análise genética de amostras de tecido tumoral parafinizado. Tal facto deve-se à existência de inúmeras amostras de tecido tumoral, devidamente identificadas histologicamente, nos diversos laboratórios de anatomia patológica. Contudo alguns problemas surgem na qualidade de DNA das amostras parafinizadas devido ao método de fixação com formaldeído que promove a degradação do DNA. Deste modo foi pretendido neste trabalho comparar os resultados genéticos e epigenéticos das amostras de tecido parafinizado com as amostras de tecido fresco correspondente, de forma a validar este material para estudos retrospectivos. A validação deste material constitui uma mais-valia, uma vez que permitirá alargar o *n* amostral da população com cancro oral e assim realizar uma caracterização do perfil genético do CPCCO mais precisa e rigorosa.

A quantidade e qualidade do DNA das amostras parafinizadas foi avaliada por métodos espectroscópicos que indicam baixas concentrações e níveis de impureza elevados. Assim, tendo em conta a quantidade e qualidade do DNA, foram selecionadas apenas dez amostras de tecido tumoral incluído em parafina para análise por MS-MLPA. Após a realização da eletroforese em gel de agarose verificou-se a ausência de

DNA em todas as amostras parafinizadas, mesmo após o aumento da concentração de DNA aplicada. Tal facto pode ser devido à elevada presença de impurezas nas amostras que impedem a ligação do DNA ao corante utilizado. Desta forma, seria interessante a realização de uma nova eletroforese em gel de agarose utilizando outro corante com maior capacidade de intercalação no DNA, por exemplo o brometo de etídeo. Contudo, apesar da obtenção de resultados pouco satisfatórios na qualidade das amostras parafinizadas procedeu-se à realização da análise genética por MS-MLPA. Na análise do eletroferograma das amostras incluídas em parafina verificou-se que os valores de concentração obtidos através da quantificação com o espectrofotómetro não correspondem à realidade, deste modo foi necessário repetir a análise para cada paciente de forma a aumentar a concentração de DNA aplicada e assim obter eletroferogramas com qualidade para análise. A existência de diversos estudos que utilizam a técnica de MLPA em DNA extraído de tecido parafinado, demonstra a eficiência e reprodutibilidade desta técnica na análise das alterações genéticas deste tipo de material.^{118,184,185} Contudo, a primeira dificuldade sentida na análise das amostras parafinizadas foi a existência de poucas amostras de tecido controlo parafinado e a presença de inúmeras alterações no número de cópias destes controlos, não sendo possível perceber se estas alterações se devem à degradação de DNA promovida pelo método de parafinação das amostras ou se correspondem a alterações genéticas presentes nas células do fibroma removido aos indivíduos saudáveis. Desta forma foram analisadas apenas as alterações no padrão de metilação das amostras parafinizadas, uma vez que esta análise não necessita de amostras controlo. Para a comparação das alterações epigenéticas nos dois materiais em estudo, deve ter-se em conta que as amostras de tecido tumoral fresco podem apresentar níveis de mosaicismos superiores às amostras de tecido tumoral parafinado, uma vez que estas últimas se encontram bem classificadas histologicamente. Contudo pode ocorrer a presença de falsos negativos nas amostras parafinizadas, originando o aparecimento de uma falsa deleção, devido à degradação de DNA promovida pelo processo de parafinação. Tendo em conta as dificuldades sentidas na análise genética de amostras incluídas em parafina, a comparação dos resultados epigenéticos dos dois materiais em estudo (tecido fresco/parafina) foi realizada com base na ausência ($\leq 25\%$) ou presença ($> 25\%$) de metilação. Dos 25 genes supressores tumorais analisados verificou-se concordância completa em 18 genes e concordância mediana em 6 genes. Deste modo a concordância entre as amostras de tecido tumoral fresco e incluído em parafina foi satisfatória para

todos os genes analisados com a exceção do gene *MSH6*. Este gene apresenta um valor de concordância baixo, contudo na observação da percentagem de metilação deste gene, é possível verificar que os valores se encontram no limite dos intervalos estabelecidos para a metilação, tanto no paciente 1 como no 26 (ver valores de percentagem de metilação no anexo VII). Desta forma, pode sugerir-se que a ausência de concordância em alguns genes se deve principalmente ao intervalo de metilação estabelecido. Também o aumento do poder estatístico, através do aumento do n , amostral poderia demonstrar maior concordância entre o tecido tumoral fresco e incluído em parafina.

A validação das amostras parafinizadas para estudos genéticos e epigenéticos, possibilitaria a análise de uma grande quantidade de amostras tumorais, bem caracterizadas histologicamente, face ao elevado manancial de amostras parafinizadas armazenadas nos laboratórios de anatomia patológica. O estudo de um elevado número de amostras com diagnóstico de CPCCO parece ser essencial para uma correta caracterização genética e epigenética destes tumores, bem como para estabelecer biomarcadores com valor de diagnóstico e prognóstico de forma a auxiliar o diagnóstico clínico e a escolha do tratamento.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

CAPÍTULO V – CONCLUSÃO

A realização deste trabalho experimental permitiu de uma forma geral atingir os objetivos propostos inicialmente. Com a realização deste estudo foi possível concluir que:

- A técnica de MS-MLPA representa um método simples, rápido, eficiente e de baixo custo para a análise de alterações no número de cópias e no padrão de metilação de amostras de tecido tumoral.
- A análise genética por MS-MLPA das 30 amostras de tecido tumoral fresco permitiu identificar diversas alterações no número de cópias de 37 genes supressores tumorais e alterações no nível de metilação de 13 destes genes;
- As alterações genéticas e epigenéticas mais frequentes da população em estudo encontram-se, por ordem decrescente, nos genes *WT1* (11p13), *GSTP1* (11q13), *BRCA1* (17q21), *GATA5* (20q13.33), *CDKN2A* (9p21), *PYCARD* (16p11.2), *PAX5* (9p13), *MLH3* (14q24.3), *MSH6* (2p16), *CASR* (3q21.1) e *TP53* (17p13.1), sugerindo a importância destes genes para o desenvolvimento e progressão da carcinogénese oral.
- A metilação do promotor do gene supressor tumoral *WT1* corresponde à alteração mais frequente (66,7%) na população analisada. Estudos referem a presença de correlação entre a expressão de *WT1* e o grau de diferenciação tumoral em diversas neoplasias. Deste modo, a deteção de elevada percentagem de metilação na população analisada reforça a importância deste gene para o desenvolvimento da carcinogénese, assim como leva a sugerir que o seu nível de expressão pode ser utilizado como fator de prognóstico para o CPCCO.
- A presença de alteração no gene *CDKN2A*, nomeadamente a perda do material genético, corresponde a um evento frequente na população analisada. Estes resultados encontram-se de acordo com a literatura, uma vez que este gene é considerado um biomarcador importante para o desenvolvimento e progressão do cancro oral.

- Não foi possível correlacionar as alterações genéticas e epigenéticas observadas com as características clinico-patológicas dos pacientes em estudo. Esta relação é por vezes controversa, continuando também por esclarecer em diversos estudos;
- O painel de sondas escolhido neste trabalho demonstrou ser eficiente na identificação das alterações genéticas e epigenéticas presentes em determinados genes supressores tumorais associados ao cancro oral. Contudo, tendo em conta as diversas tecnologias moleculares, de elevada resolução, que permitem a identificação de alterações em todo o genoma, é fundamental o desenvolvimento de novos painéis de sondas direcionados para o cancro oral. Estes devem incluir alguns dos genes estabelecidos como biomarcadores para esta neoplasia, assim como outros genes associados à progressão e desenvolvimento do CPCCO;
- A utilização de tecido parafinado como fonte de material para a realização de estudos genéticos afigura-se problemática, tendo em conta a qualidade do DNA extraído destas amostras, inviabilizando a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Deste modo é necessário realizar estudos de forma a melhorar os métodos de extração de DNA, assim como aumentar o número de amostras utilizadas para aumentar a concordância entre os resultados obtidos no tecido fresco e incluído em parafina. Do mesmo modo, para uma correta comparação das alterações no número de cópias de amostras tumorais parafinizadas, é necessário a aquisição de novas amostras de tecido normal da cavidade oral incluído em parafina de indivíduos saudáveis, em quantidade e qualidade desejável para a análise por MS-MLPA

PRESPECTIVAS FUTURAS DE INVESTIGAÇÃO:

O envelhecimento populacional, a crescente exposição a agentes carcinogénicos e os maus hábitos alimentares da sociedade moderna dos países desenvolvidos, contribuem para o aumento do aparecimento de neoplasias, nomeadamente o cancro oral. As taxas de incidência e mortalidade associadas ao CPCCO atingem na atualidade níveis elevados. Mitka¹⁸⁶ refere o aumento destas taxas a nível mundial, especialmente nos indivíduos jovens, estimando para o ano de 2013 a existência de 36 000 novos casos e 6850 mortes associadas ao cancro oral. Deste modo, nos últimos anos, o interesse no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do cancro oral tem aumentado. Mesmo com os avanços observados no campo terapêutico, não se verifica grande diminuição das taxas de incidência e mortalidade atribuídas ao CPCCO a nível mundial. Este facto indica a urgente necessidade de desenvolver novas investigações e estratégias, no sentido de compreender melhor as alterações genéticas responsáveis pelo aparecimento desta neoplasia. É neste contexto que se insere este projeto, uma vez que é pretendida a análise das alterações no número de cópias e do padrão de metilação de determinados genes supressores tumorais em amostras de tecido de CPCCO. Uma limitação deste estudo foi o tamanho da população analisada (30 pacientes). Deste modo a realização de novos estudos com um número de amostras tumorais e controlo superior é fundamental para a correlação das características clinico-patológicas com as alterações genéticas e epigenéticas dos pacientes. O aumento do número de pacientes, tendo em conta a localização anatómica do tumor, permitirá estabelecer uma correlação entre o fenótipo e o genótipo desta neoplasia. Também o conhecimento das características dos indivíduos, como o sexo, idade e ainda os seus hábitos tabágicos e alcoólicos representa um factor importante para a caracterização da população em estudo. Tendo em conta que os principais factores de risco para o cancro oral seja o consumo de tabaco e álcool, seria interessante a utilização de um grupo controlo de não fumadores e, eventualmente alargar a população de indivíduos saudáveis formando outro grupo controlo de fumadores, na tentativa de determinar as alterações induzidas pelo consumo de tabaco. Porém a dificuldade de obtenção de amostras de tecido de indivíduos saudáveis é grande.

A utilização de apenas um painel de sondas, que apresenta sondas específicas para 38 genes supressores tumorais dispersos por todo o genoma, não permite estabelecer um

padrão característico de alterações nos diversos cromossomas. Deste modo a adição de novos painéis de sondas, na análise dos mesmos pacientes, permitirá de forma mais consistente determinar um padrão de alterações característico no seu genoma. A presença de diversas sondas para a mesma região cromossómica é um factor importante na determinação das alterações no número de cópias das amostras, uma vez que um dos problemas da análise molecular de amostras tumorais é a presença de mosaicismo. O MS-MLPA emerge como uma técnica sensível, precisa e de baixo custo para a sua utilização no diagnóstico rotineiro de lesões da cavidade oral, assim como na realização do *follow-up* de pacientes e ainda no estabelecimento de um rastreio nacional de populações de elevado risco. Deste modo será fundamental o desenvolvimento de um painel que contenha sondas específicas para os genes que possuem papel fundamental no desenvolvimento da carcinogénese oral.

O conhecimento aprofundado dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento e progressão do cancro oral permitiria estabelecer biomarcadores específicos para esta neoplasia, possibilitando a sua deteção em estadios iniciais de desenvolvimento e assim, diminuir as elevadas taxas de incidência e mortalidade atribuídas a esta doença.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*. 2009;4:49–70.
2. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;11(1):9–22.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69–90.
4. GLOBOCAN 2008. Available at: <http://globocan.iarc.fr/>. Accessed October 29, 2012.
5. Encyclopaedia Britannica Online. Available at: <http://www.britannica.com/media/full/68879>. Accessed October 30, 2012.
6. Van der Waal I, de Bree R, Brakenhoff R, Coebergh J. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible? *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2011:e300–e305.
7. De Sousa DA. Contribuição para o estudo do carcinoma pavimentocelular da mucosa oral. Factores tumorais de prognóstico. Tese de Doutoramento em Medicina Dentária Cirurgia Oral apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, 2009.
8. Rhodus NL. Oral Cancer and Precancer: Improving Outcomes. *Compendium*. 2009;30(8):486.
9. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Cr R Oral B*. 2003;14(1):47–62.
10. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, Van der Waal I. *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*. 30, (Springer New York, 1997).
11. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963–968.
12. Thomson PJ. Field change and oral cancer: new evidence for widespread carcinogenesis? *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31(3):262–266.
13. Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and a statistical study. *Am J Cancer*. 1932.
14. Boudewijn J M, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist*. 2005;10(7):493–500.
15. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyrynkans K, Soini Y, Alho OP, Salo T. Prognostic factors in tongue cancer—relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *British journal of cancer*. 2000;83(5):614–619.
16. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2002;52(4):195–215.

17. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Available at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-grade>. Accessed February 24, 2013.
18. Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the lip: A study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA*. 1920;74(10):656–664.
19. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2006;42(3):229–239.
20. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):309–316.
21. Shuei-Kuen, Tseng S-K, Chang M-C, Su C-Y, Chi L-Y, Chang JZ-C, Tseng W-Y, Yeung S-Y, Hsu M-L, Jeng J-H. Arecoline induced cell cycle arrest, apoptosis, and cytotoxicity to human endothelial cells. *Clin Oral Invest*. 2012;16(4):1267–1273.
22. Trivedy CR, Craig G, Warnakulasuriya S. The oral health consequences of chewing areca nut. *Addiction Biology*. 2002;7(1):115–125.
23. Monteiro LS, Salazar F, Pacheco J, Warnakulasuriya S. Oral Cancer Awareness and Knowledge in the City of Valongo, Portugal. *International Journal of Dentistry*. 2012;2012:1–8.
24. Dias GS, Almeida AP de. A histological and clinical study on oral cancer: Descriptive analyses of 365 cases. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2007;12(7):474–478.
25. Pinheiro PS, Tyczyński JE, Bray F, Amado J, Matos E, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in Portugal. *European Journal of Cancer*. 2003;39(17):2507–2520.
26. Warnakulasuriya S, Mak V, Möller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncology*. 2007;43(10):982–986.
27. Llewellyn C., Johnson N., Warnakulasuriya KAA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people — a comprehensive literature review. *Oral Oncology*. 2001;37(5):401–418.
28. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncology*. 2004;40(3):304–313.
29. Manuel S, Raghavan SKN, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2003;32(2):167–173.
30. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, Strome SE, Haddad RI, Patel SS, Cambell EV, Sarlis N, Lorch J, Cullen KJ. Racial Survival Disparity in Head and Neck Cancer Results from Low Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Black Oropharyngeal Cancer Patients. *Cancer Prev Res*. 2009;2(9):776–781.
31. Shavers VL, Brown ML. Racial and ethnic disparities in the receipt of cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(5):334–357.

32. Chen LM, Li G, Reitzel LR, Pytynia KB, Zafereo ME, Wei Q, Sturgis EM. Matched-Pair Analysis of Race or Ethnicity in Outcomes of Head and Neck Cancer Patients Receiving Similar Multidisciplinary Care. *Cancer Prev Res.* 2009;2(9):782–791.
33. Brawley OW. Oropharyngeal Cancer, Race, and the Human Papillomavirus. *Cancer Prev Res.* 2009;2(9):769–772.
34. Kawakita D, Hosono S, Ito H, Oze I, Watanabe M, Hanai N, Hasegawa Y, Tajima K, Murakami S, Tanaka H, others. Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. *Oral oncology.* 2012;48:186–191.
35. Sá A. Incidência, mortalidade e sobrevivência dos carcinomas orais no distrito de Viana do Castelo. Tese de Mestrado em Oncologia apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, 2008.
36. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral oncology.* 1997;33(5):302–312.
37. Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res.* 2002;8(10):3187–3192.
38. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Human Pathology.* 2002;33(6):608–614.
39. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2005;14(2):467–475.
40. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer.* 2002;2(5):342–350.
41. Roh J-L, Ko JH, Moon SJ, Ryu CH, Choi JY, Koch WM. The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer Lett.* 2012;325(1):35–41.
42. Cruz I, Van den Brule AJC, Steenbergen RDM, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Snow GB, Van der Waal I. Prevalence of Epstein—Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa—a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncology.* 1997;33(3):182–188.
43. Horiuchi K, Mishima K, Ichijima K, Sugimura M, Ishida T, Kirita T. Epstein-Barr virus in the proliferative diseases of squamous epithelium in the oral cavity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 1995;79(1):57–63.
44. Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral oncology.* 2004;40(2):207–213.
45. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. *The Journal of the American Dental Association.* 1999;130(10):1445–1457.
46. Langevin SM, Michaud DS, Eliot M, Peters ES, McClean MD, Kelsey KT. Regular dental visits are associated with earlier stage at diagnosis for oral and pharyngeal cancer. *Cancer Causes Control.* 2012;23(11):1821–1829.

47. Rizzolo D, Hanifin C, Chiodo TA. Oral cancer: how to find this hidden killer in 2 minutes. *JAAPA*. 2007;20(10):42–47.
48. Kugimoto T, Morita K, Omura K. Development of oral cancer screening test by detection of squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells. *Oral Oncology*. 2012;48(9):794–798.
49. Ravi, Mehrotra R, Gupta DK. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head Neck Oncol*. 2011;3:33.
50. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molecular Cancer*. 2006;5(1):11.
51. Franzmann EJ, Reategui EP, Carraway KL, Hamilton KL, Weed DT, Goodwin WJ. Salivary Soluble CD44: A Potential Molecular Marker for Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(3):735–739.
52. Xie GX, Chen TL, Qiu YP, Shi P, Zheng XJ, Su MM, Zhao AH, Zhou ZT, Jia W. Urine metabolite profiling offers potential early diagnosis of oral cancer. *Metabolomics*. 2012;8(2):220–231.
53. Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, Shaligram C, Portugal LG. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head & Neck*. 1999;22(1):34–41.
54. Sanjiv K, Su T-L, Suman S, Kakadiya R, Lai T-C, Wang H-Y, Hsiao M, Lee T-C. The novel DNA alkylating agent BO-1090 suppresses the growth of human oral cavity cancer in xenografted and orthotopic mouse models. *Int J Cancer*. 2012;130(6):1440–1450.
55. Gold KA, Lee H-Y, Kim ES. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2009;115(5):922–935.
56. Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, Sutton D, Errington D, Vaughan D. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncology*. 2009;45(3):201–211.
57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
58. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546–1558.
59. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(2):157–162.
60. Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *PNAS*. 1998;95(23):13692–13697.
61. Kloosterman WP, Cuppen E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013.
62. Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen MJ, van Binsbergen E, Renkens I, Duran K, Ballarati L, Vergult S, Giardino D, Hansson K, Ruivenkamp CAL, Jager M, van Haeringen A, Ippel EF, Haaf T, Passarge E, Hochstenbach R, Menten B, Larizza L, Guryev V, Poot M, Cuppen E. Constitutional chromothripsis rearrangements involve

- clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. *Cell Rep.* 2012;1(6):648–655.
63. Philip, Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin M-L, McBride DJ, Varela I, Nik Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell.* 2011;144(1):27–40.
 64. Cha JD, Kim HJ, Cha IH. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2011;111(5):594–607.
 65. Scully C, Tanzawa H, Field JK. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology* 2000;36(3):256–263.
 66. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research.* 1996;56(11):2488–2492.
 67. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727–1730.
 68. Tu H-F, Chang K-W, Chiang W-F, Liu C-J, Yu E-H, Liu S-T, Lin S-C. The frequent co-expression of the oncogenes PIK3CA and PAK1 in oral carcinomas. *Oral Oncology* 2011;47(3):211–216.
 69. Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RC, Albertson DG. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2005;24(26):4232–4242.
 70. Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral Oncology.* 2012;48(7):578–584.
 71. Vincent-Chong VK, Anwar A, Karen-Ng LP, Cheong SC, Yang Y-H, Pradeep PJ, Rahman ZAA, Ismail SM, Zaini ZM, Prepageran N, Kallarakkal TG, Ramanathan A, Mohayadi NABM, Rosli NSBM, Mustafa WMW, Abraham MT, Tay KK, Zain RB. Genome Wide Analysis of Chromosomal Alterations in Oral Squamous Cell Carcinomas Revealed over Expression of MGAM and ADAM9. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e54705.
 72. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, Rosa GD, Staibano S. Epigenetic Disregulation in Oral Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2012;13(2):2331–2353.
 73. Mydlarz WK, Hennessey PT, Califano JA. Advances and perspectives in the molecular diagnosis of head and neck cancer. *Expert opinion on medical diagnostics.* 2010;4(1):53–65.
 74. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics.* 2012;13(7):484–492.

75. Yehudit, Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(3):274–281.
76. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *The Lancet Oncology.* 2006;7(1):77–82.
77. Díez Pérez R, Campo Traper J, Cano Sanchez J, Lopez Duran M, Gonzalez-Moles MA, Campo Trapero J, Cano Sánchez J, López Durán M, Gonzalez Moles MA, Bascones Ilundain J, Bascones Martinez A. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncol Rep.* 2011;25(5):1203–1209.
78. Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, Nygren AOH, Errami A, Schouten JP, Benninger MS. Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery.* 2006;132(6):668.
79. González-Ramírez I, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Sánchez-Pérez Y, Anaya-Saavedra G, Granados-García M, García-Vázquez F, García-Cuellar CM. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral oncology.* 2011;47(1):22–26.
80. Liu Y, Zhou Z-T, He Q-B, Jiang W-W. DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients. *Medical Oncology.* 2012;29(2):729–733.
81. Tanic N, Dedovic-Tanic N, Popovic B, Kosanovic R, Milasin J. Moleculobiological characteristics of oral squamous cell carcinomas. *Stomatoloski glasnik Srbije.* 2011;58(2):67–74.
82. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology.* 4th edition (New York 2000).
83. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *European Respiratory Journal.* 2009;33(6):1485–1497.
84. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006;366(1):2–16.
85. Schuler PJ, Boeckers P, Engers R, Boelke E, Bas M, Greve J, Dumitru CA, Lehnerdt GF, Ferris RL, Andrade Filho PA. EGFR-specific T cell frequencies correlate with EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med.* 2011;9:168.
86. Xia W, Lau Y-K, Zhang H-Z, Xiao F-Y, Johnston DA, Liu A-R, Li L, Katz RL, Hung M-C. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 Is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):4164–4174.
87. Nagatsuka H, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Nakano K, Nagai N. Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. *Oral Oncology* 2001;37(7):599–604.
88. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa J-P, Lee JJ, Mao L. Epidermal Growth Factor Receptor Copy Number Alterations Correlate With Poor Clinical Outcome in Patients With Head and Neck Squamous Cancer. *JCO.* 2007;25(16):2164–2170.

89. Myers JN HF. Targeted molecular therapy for oral cancer with epidermal growth factor receptor blockade: A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(8):875–879.
90. Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. In: *Seminars in oncology*. Vol 33.; 2006:369–385.
91. Balzs, Szabó B, Nelhubel GA, Karpati A, Kenessey I, Jori B, Kárpáti A, Jóri B, Székely C, Peták I, Lotz G, Hegedus Z, Hegedus B, Füle T, Döme B, Tímár J, Tóvári J. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 2011;47(6):487–496.
92. Huang K-H, Huang S-F, Chen I-H, Liao C-T, Wang H-M, Hsieh L-L. Methylation of RASSF1A, RASSF2A, and HIN-1 is associated with poor outcome after radiotherapy, but not surgery, in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):4174–4180.
93. Saranath D, Panchal RG, Nair R, Mehta AR, Sanghavi V, Sumegi J, Klein G, Deo MG. Oncogene Amplification in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer Science.* 1989;80(5):430–437.
94. Bernhard EJ, Stanbridge EJ, Gupta S, Gupta AK, Soto D, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Muschel RJ, McKenna WG. Direct Evidence for the Contribution of Activated N-ras and K-ras Oncogenes to Increased Intrinsic Radiation Resistance in Human Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* 2000;60(23):6597–6600.
95. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 2011;3(3):192–222.
96. Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, Bennett BP, Su GH. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1441–1446.
97. Sparano A, Quesnelle KM, Kumar MS, Wang Y, Sylvester AJ, Feldman M, Sewell DA, Weinstein GS, Brose MS. Genome-Wide Profiling of Oral Squamous Cell Carcinoma by Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *The Laryngoscope.* 2006;116(5):735–741.
98. Hinds PW, Arnold A, Dowdy SF, Eaton EN, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 1994;91(2):709–713.
99. Imoto M, Doki Y, Jiang W, Han E, Weinstein IB. Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events. *Exp Cell Re.* 1997;236(1):173–180.
100. Schuurin E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes--a review. *Gene (AMST).* 1995;159(1):83–96.

101. Hassan NMM, Tada M, Hamada J, Kashiwazaki H, Kameyama T, Akhter R, Yamazaki Y, Yano M, Inoue N, Moriuchi T. Presence of dominant negative mutation of TP53 is a risk of early recurrence in oral cancer. *Cancer Letters*. 2008;270(1):108–119.
102. Daisuke, Sano D, Xie T-X, Ow TJ, Zhao M, Pickering CR, Zhou GE, Sandulache VC, Wheeler DA, Gibbs RA, Caulin C, Myers JN. Disruptive TP53 mutation is associated with aggressive disease characteristics in an orthotopic murine model of oral tongue cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(21):6658–6670.
103. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, Le Bihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, Armand JP, Riou G. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene*. 1995;10(6):1217–1227.
104. Szanyi I, Bauer M, Gerlinger I, Járαι T, Göbel G, Lujber L, Szabadi É, Fehér K, Ember Á, Ember I, Kiss I. Changes in expression of oncogenes and TP53 tumour suppressor gene as biomarkers in head and neck cancers. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2010;268(7):1041–1046.
105. Bilde A, Von Buchwald C, Dabelsteen E, Therkildsen MH, Dabelsteen S. Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2009;38(1):72–78.
106. Chen K, Sawhney R, Khan M, Benninger MS, Hou Z, Sethi S, Stephen JK, Worsham MJ. Methylation of multiple genes as diagnostic and therapeutic markers in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery*. 2007;133(11):1131.
107. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Hino S, Hamakawa H. Detection of p16 promoter methylation in the serum of oral cancer patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;35(4):362–365.
108. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*. 2002;30(12):e57–e57.
109. Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2012;21(4):189–206.
110. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *British journal of cancer*. 2004;91(6):1155–1159.
111. MRC-Holland. MLPA: Cost-effective and sensitive genomic and methylation profiling. Available at: <http://www.mlpa.com>. Accessed November 10, 2012.
112. MRC-Holland. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Copy number quantification and Methylation detection. Available at: <http://www.mlpa.com>. Accessed November 10, 2012.
113. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous

- detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(14):e128–e128.
114. MRC-Holland. MRC-Holland. Available at: <http://www.mlpa.com>. Accessed March 29, 2013.
 115. MRC-Holland. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): General Protocol. Available at: <http://www.mlpa.com>. Accessed November 10, 2012.
 116. MRC-Holland. Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA): General Protocol. Available at: <http://www.mlpa.com>. Accessed March 29, 2013.
 117. Oliveira C. Banco de tumores. *Acta Med Port*. 2007;20:325–333.
 118. De Jong D, Verbeke SL, Meijer D, Hogendoorn PC, Bovee JV, Szuhai K. Opening the archives for state of the art tumour genetic research: sample processing for array-CGH using decalcified, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue-derived DNA samples. *BMC Res Notes*. 2011;4:1.
 119. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J. Effect of Fixation to the Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA in Different Tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(3):371–374.
 120. Ribeiro IP. Avaliação do perfil genético do carcinoma epidermoide da cavidade oral por MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Tese de Mestrado em Genética Molecular apresentada à Escola de Ciências da Universidade do Minho, 2011.
 121. High Pure PCR Template Preparation Kit. Available at: <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/high-pure-pcr-template-preparation-kit>. Accessed April 2, 2013.
 122. QIAGEN - QIAamp DNA FFPE Tissue Kit - For purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissues. Available at: <http://www.qiagen.com/products/qiaampdnaffpetissuekit.aspx#Tabs=t1>. Accessed January 9, 2013.
 123. Thermo Scientific - NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Available at: <http://www.nanodrop.com/default.aspx>. Accessed February 24, 2013.
 124. MRC-Holland. Product description ME002-C1-0412 Tumour Suppressor 2. Available at: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx>. Accessed March 23, 2013.
 125. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159.
 126. Procter M, Chou L-S, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular Diagnosis of Prader–Willi and Angelman Syndromes by Methylation-Specific Melting Analysis and Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Clinical Chemistry*. 2006;52(7):1276–1283.
 127. Lalic T, Vossen RHAM, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, Djuriscic M, Breuning MH, White SJ, den Dunnen JT. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(11):1231–1234.

128. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhim R, Lin WM, Province MA, Kraja A, Johnson LA, Shah K, Sato M, Thomas RK, Barletta JA, Borecki IB, Broderick S, Chang AC, Chiang DY, Chirieac LR, Cho J, Fujii Y, Gazdar AF, Giordano T, Greulich H, Hanna M, Johnson BE, Kris MG, Lash A, Lin L, Lindeman N, Mardis ER, McPherson JD, Minna JD, Morgan MB, Nadel M, Orringer MB, Osborne JR, Ozenberger B, Ramos AH, Robinson J, Roth JA, Rusch V, Sasaki H, Shepherd F, Sougnez C, Spitz MR, Tsao M-S, Twomey D, Verhaak RGW, Weinstock GM, Wheeler DA, Winckler W, Yoshizawa A, Yu S, Zakowski MF, Zhang Q, Beer DG, Wistuba II, Watson MA, Garraway LA, Ladanyi M, Travis WD, Pao W, Rubin MA, Gabriel SB, Gibbs RA, Varmus HE, Wilson RK, Lander ES, Meyerson M. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007;450(7171):893–898.
129. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. A diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn*. 2006;8(4):433–443.
130. Marcos CÁ, Alonso-Guervós M, Prado NR, Gimeno TS, Iglesias FD, Hermsen M, Llorente JL. Genetic model of transformation and neoplastic progression in laryngeal epithelium. *Head & neck*. 2010;33(2):216–224.
131. Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, Coksuer H, Buyru N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;4(6):1092.
132. Verschuur-Maes AH, de Bruin PC, van Diest PJ. Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;136(3):705–715.
133. Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *The Journal of pathology*. 2011;225(2):222–231.
134. Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Japanese journal of clinical oncology*. 2010;40(5):377–387.
135. Van Heyningen, Davies R, Moore A, Schedl A, Bratt E, Miyahawa K, Lodomery M, Miles C, Menke A, Van Heyningen V, Hastie N. Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Cancer Res*. 1999;59(7 Suppl):1747S–1750S.
136. Adina, Brett A, Pandey S, Fraizer G. The Wilms' tumor gene (WT1) regulates E-cadherin expression and migration of prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2013;12:3.
137. Oji Y, Inohara H, Nakazawa M, Nakano Y, Akahani S, Nakatsuka S, Koga S, Ikeba A, Abeno S, Honjo Y, Yamamoto Y, Iwai S, Yoshida K, Oka Y, Ogawa H, Yoshida J, Aozasa K, Kubo T, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*. 2003;94(6):523–529.
138. Hylander B, Repasky E, Shrikant P, Intengan M, Beck A, Driscoll D, Singhal P, Lele S, Odunsi K. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2006;101(1):12–17.
139. Gasche JA, Hoffmann J, Boland CR, Goel A. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2011;129(5):1053–1063.

140. Viet CT, Schmidt BL. Methylation array analysis of preoperative and postoperative saliva DNA in oral cancer patients. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008;17(12):3603–3611.
141. Laux DE, Huang T, Curran EM, Welshons WV, Lubahn DB. Hypermethylation of the Wilms' tumor suppressor gene CpG island in human breast carcinomas. *Breast Cancer Research & Treatment*. 1999;56(1):35–43.
142. Hiltunen MO, Koistinaho J, Alhonen L, Myrskylä S. Hypermethylation of the WT1 and calcitonin gene promoter regions at chromosome 11p in human colorectal cancer. *British journal of cancer*. 1997;76(9):1124.
143. Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Shiina H, Yamada H, Yamamoto R, Sakuragi N, Enokida H, Verma M, Dahiya R. WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Cancer*. 2005;104(9):1924–1930.
144. Xu Z, Zhu H, Luk JM, Wu D, Gu D, Gong W, Tan Y, Zhou J, Tang J, Zhang Z, Wang M, Chen J. Clinical significance of SOD2 and GSTP1 gene polymorphisms in Chinese patients with gastric cancer. *Cancer*. 2012;118(22):5489–5496.
145. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2001;154(2):95–105.
146. Troy JD, Weissfeld JL, Diergaard B, Youk AO, Buch SC, Romkes M, Grandis JR. Polymorphisms in NAT2 and GSTP1 are associated with survival in oral and oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiology*. 2013;37(4):505–511.
147. Pande M, Amos CI, Osterwisch DR, Chen J, Lynch PM, Broaddus R, Frazier ML. Genetic Variation in Genes for the Xenobiotic-Metabolizing Enzymes CYP1A1, EPHX1, GSTM1, GSTT1, and GSTP1 and Susceptibility to Colorectal Cancer in Lynch Syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(9):2393–2401.
148. Nosheen, Masood N, Kayani MA. Mutational analysis of xenobiotic metabolizing genes (CYP1A1 and GSTP1) in sporadic head and neck cancer patients. *Genet Mol B*. 2011;34(4):533–538.
149. Kollermann J, Kempkensteffen C, Helpap B, Schrader M, Krause H, Muller M, Miller K, Schostak M. Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer. *BMC Urology*. 2006;6(1):15.
150. Dumache R, Puiu M, Canciu C, Cucu N. DNA methylation of GSTP1, a promising biomarker in early detection of prostate cancer. *Toxicology Letters*. 2009;189:S161.
151. Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez ST, Allonca E, González MV, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *The Journal of Pathology*. 2009;217(4):516–523.
152. Karolina, Holm K, Staaf J, Jonsson G, Vallon Christersson J, Gunnarsson H, Jönsson G, Arason A, Magnusson L, Barkardottir RB, Hegardt C, Ringnér M, Borg A. Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in CCND1-amplified sporadic and familial breast tumours. *Breast Cancer Research & Treatment*. 2012;133(2):583–594.

153. Mitrovic O, Micic M, Cokic V, Koko V, Djikic D, Budec M, Vignjevic S, Brekovic T. BRCA1 and TOP2A gene amplification and protein expression in four molecular subtypes of breast cancer. *Archives of Biological Sciences*. 2013;65(2):511–518.
154. Rosen EM. BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocrine Related Cancer*. 2005;12(3):533–548.
155. Deng C-X. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research*. 2006;34(5):1416–1426.
156. Nemer G, Qureshi ST, Malo D, Nemer M. Functional analysis and chromosomal mapping of Gata5, a gene encoding a zinc finger DNA-binding protein. *Mammalian genome*. 1999;10(10):993–999.
157. Wang X, Kang GH, Campan M, Weisenberger DJ, Long TI, Cozen W, Bernstein L, Wu AH, Siegmund KD, Shibata D, Laird PW. Epigenetic Subgroups of Esophageal and Gastric Adenocarcinoma with Differential GATA5 DNA Methylation Associated with Clinical and Lifestyle Factors. Ballestar E, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e25985.
158. Peters I, Eggers H, Atschekzei F, Hennenlotter J, Waalkes S, Tränkenschuh W, Großhennig A, Merseburger AS, Stenzl A, Kuczyk MA, Serth J. GATA5 CpG island methylation in renal cell cancer: a potential biomarker for metastasis and disease progression. *BJU International*. 2012;110(2b):E144–E152.
159. Guo M, House MG, Akiyama Y, Qi Y, Capagna D, Harmon J, Baylin SB, Brock MV, Herman JG. Hypermethylation of the GATA gene family in esophageal cancer. *International Journal of Cancer*. 2006;119(9):2078–2083.
160. Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular Medicine*. 1997;3(1):5.
161. Rocco JW, Li D, Liggett WH, Duan L, Saunders JK, Sidransky D, O'Malley BW. p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer. *Clinical cancer research*. 1998;4(7):1697–1704.
162. Worsham MJ PG. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(7):702–708.
163. Hong S, Hwang I, Lee Y-S, Park S, Lee W-K, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Kim Y-S, Yu J-W. Restoration of ASC expression sensitizes colorectal cancer cells to genotoxic stress-induced caspase-independent cell death. *Cancer Letters*. 2013;331(2):183–191.
164. Andrew, Mhyre AJ, Marcondes AM, Spaulding EY, Deeg HJ. Stroma-dependent apoptosis in clonal hematopoietic precursors correlates with expression of PYCARD. *Blood-the Journal of Hematology*. 2009;113(3):649–658.
165. McConnell BB, Vertino PM. Activation of a caspase-9-mediated apoptotic pathway by subcellular redistribution of the novel caspase recruitment domain protein TMS1. *Cancer Res*. 2000;60(22):6243–6247.
166. Motani K, Kawase K, Imamura R, Kinoshita T, Kushiyaama H, Suda T. Activation of ASC induces apoptosis or necrosis, depending on the cell type, and causes tumor eradication. *Cancer Science*. 2010;101(8):1822–1827.

167. Drexler SK, Bonsignore L, Masin M, Tardivel A, Jackstadt R, Hermeking H, Schneider P, Gross O, Tschopp J, Yazdi AS. Tissue-specific opposing functions of the inflammasome adaptor ASC in the regulation of epithelial skin carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(45):18384–18389.
168. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2007;73(1):1–14.
169. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology*. 2007;8(5):463–470.
170. Palmisano WA, Crume KP, Grimes MJ, Winters SA, Toyota M, Esteller M, Joste N, Baylin SB, Belinsky SA. Aberrant Promoter Methylation of the Transcription Factor Genes PAX5 α and β in Human Cancers. *Cancer Res*. 2003;63(15):4620–4625.
171. Ya-shuang, Zhao Y-S, Hu F-L, Wang F, Han B, Li D-D, Li X-W, Zhu S. Meta-analysis of MSH6 gene mutation frequency in colorectal and endometrial cancers. *J Toxicol Env Heal A*. 2009;72(11-12):690–697.
172. Liu H-X, Li Y, Jiang X-D, Yin H-N, Zhang L, Wang Y, Yang J. Mutation screening of mismatch repair gene Mlh3 in familial esophageal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(33):5281.
173. Wei Q, Guan YL, Cheng L, Xu JL, Eicher SA, Young LN, Saunders KC, Jiang H, Hong WK, Spitz MR, Strom SS. Reduced expression of hMLH1 and hGTBP/hMSH6: a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1998;7(4):309–314.
174. Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2009;15(3):206–213.
175. Vogelsang M, Wang Y, Veber N, Mwapagha LM, Parker MI. The Cumulative Effects of Polymorphisms in the DNA Mismatch Repair Genes and Tobacco Smoking in Oesophageal Cancer Risk. Medeiros R, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36962.
176. D’Souza-Li L. The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50(4):628–639.
177. Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Riviere M, Seldin MF, Rivière M, Szpirer J, Szpirer C, Hendy GN. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome*. 1995;6(11):798–801.
178. Elizabeth, Hibler EA, Hu C, Jurutka PW, Martinez ME, Jacobs ET. Polymorphic variation in the GC and CASR genes and associations with vitamin D metabolite concentration and metachronous colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2012;21(2):368–375.
179. Chakrabarty S, Radjendirane V, Appelman H, Varani J. Extracellular Calcium and Calcium Sensing Receptor Function in Human Colon Carcinomas Promotion of E-Cadherin Expression and Suppression of β -Catenin/TCF Activation. *Cancer Res*. 2003;63(1):67–71.

180. Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, Hendy GN, Appelman H, Varani J. Calcium Sensing Receptor in Human Colon Carcinoma: Interaction with Ca²⁺ and 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Cancer Res.* 2005;65(2):493–498.
181. Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang Z-Q, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 1999;431(2):199–209.
182. BENCHIMOL, Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes and Development.* 1990;4(1):1–8.
183. Inoue K, Kurabayashi A, Shuin T, Ohtsuki Y, Furihata M. Overexpression of p53 protein in human tumors. *Medical molecular morphology.* 2012;45(3):115–123.
184. Takata M. Detection of copy number changes at multiple loci in DNA prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Methods Mol Biol.* 2008;439:101–8.
185. Van Dijk MC, Rombout PD, Boots-Sprenger SH, Straatman H, Bernsen MR, Ruiter DJ, Jeuken JW. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed tissue. *Diagn Mol Pathol.* 2005;14(1):9–16.
186. Mitka M. Evidence Lacking for Benefit From Oral Cancer Screening. *JAMA.* 2013;309(18):1884–1884.
187. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed March 23, 2013.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

CAPÍTULO VII – ANEXOS

I – Modelo de consentimento informado preenchido por todos os pacientes envolvidos no estudo:

Perfil genético do carcinoma pavimento-celular da cavidade oral

Consentimento informado – Declaração do participante

Eu _____, confirmo que recebi toda a explicação sobre os procedimentos do estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Eu aceito participar voluntariamente neste estudo. Dou permissão aos investigadores para usarem os meus registos clínicos como descrito neste formulário de consentimento. Eu receberei uma cópia deste formulário de consentimento.

Assinatura do doente ou do
seu representante legal

Data

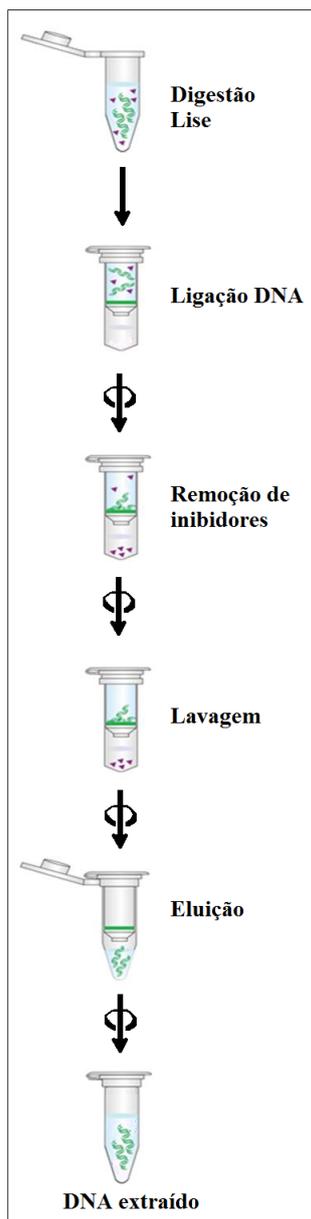
Assinatura do investigador

Data

II – Protocolo de extração de DNA genómico a partir de tecidos fresco recorrendo ao método *High Pure PCR Template Preparation Kit*:

A amostra de tecido fresco para extração deve conter entre 25-50 mg de tecido, uma vez que uma quantidade superior de tecido poderá promover a saturação da membrana de sílica, diminuindo desta forma a eficácia do processo de extração.

A extração de DNA genómico do material fresco inicia-se com a adição de 200 μL de tampão de lise e 40 μL de *Proteinase K*, para a digestão da amostra e inativação das

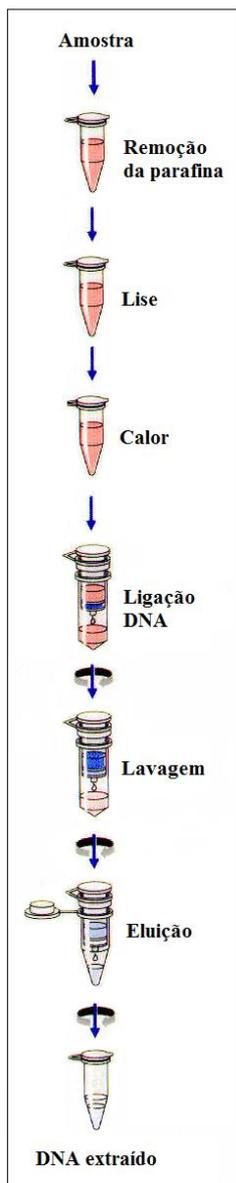


DNases endógenas. Segue-se uma incubação a 55°C até que o tecido esteja completamente digerido. É adicionado de seguida 200 μL de *Binding Buffer* para nova incubação a 70°C durante 10 min. e imediatamente a seguir é adicionado 100 μL de isopropanol, seguido de centrifugação a 8000 g durante 1 min. de forma a garantir a ligação do DNA à membrana de sílica. Posteriormente adiciona-se 500 μL de *Inhibitor Removal Buffer* seguido de nova centrifugação a 8000 g durante 1 min. O passo de lavagem consiste na adição de 500 μL de *Wash Buffer* e centrifugação a 8000 g durante 1 min. duas vezes seguidas, de forma a eliminar todos os componentes celulares que possam contaminar a membrana de sílica. Para secar completamente a membrana centrifuga-se durante 10 s a 13000 g. O DNA é posteriormente eluído em 100 μL de tampão de eluição que é pré-aquecido a 70°C, e centrifuga-se 1 min. a 80000 g, para obter o DNA puro.¹²¹

Figura 20 – Procedimento experimental de extração de DNA a partir de amostras de tecido fresco pelo método *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

III – Protocolo de extração de DNA genómico a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina recorrendo ao método *DNA FFPE tissue kit*:

A extração de DNA genómico do material parafinizado inicia-se com a desparafinização da amostra através da adição de 1mL de xileno com posterior mistura por *vortex* durante 10 segundos. Segue-se uma centrifugação durante 2 min. à velocidade máxima, eliminando-se depois o sobrenadante. É adicionado de seguida 1 mL de etanol (100%) ao *pellet*, mistura-se por *vortex* e realiza-se nova centrifugação à



velocidade máxima por 2 min. Após a remoção do sobrenadante, o *ependorf* é aberto numa estufa a 37°C até que todo o etanol residual tenha evaporado. O *pellet* é resuspenso em 180 µL de *Buffer ATL* e 20 µL de *proteinase K*, incubando de seguida o *ependorf* num banho a 56°C durante 1 hora para que a amostra seja digerida. De seguida é realizada nova incubação a 90°C durante 1 hora. Adiciona-se posteriormente 200 µL de *Buffer AL* e 200 µL de etanol (100%). Todo o lizado é de seguida transferido com cuidado para uma coluna do kit e centrifuga-se durante 1 min. a 6000 g. Descarta-se o líquido sedimentado e coloca-se a coluna num tubo de 2mL lavada, adiciona-se de seguida 500 µL de *Buffer AW1* e centrifuga-se novamente durante 1 min. a 6000 g. De seguida adiciona-se 500 µL de *Buffer AW2* e nova centrifugação. Estas etapas permitem eliminar contaminantes, deixando apenas o DNA ligado à membrana. Segue-se uma centrifugação durante 3 min. à velocidade máxima para secar totalmente a membrana. Por último o DNA é diluído em 100 µL de *Buffer ATE* e centrifuga-se durante 1 min. à velocidade máxima.¹²²

Figura 21 - Procedimento experimental de extração de DNA a partir de amostras de tecido incluído em parafina pelo método *QIAamp DNA FFPE Tissue* (QIAGEN). Adaptado de QIAGEN.¹²²

IV – Designação dos genes estudados pela técnica de MS-MLPA:

Tabela VIII - Nome e localização dos genes estudados pela técnica de MS-MLPA recorrendo ao painel de sondas *SALSA MLPA probemix ME002-C1 Tumour Suppressor*.^{124,187}

Gene	Localização	Nome
<i>APC</i>	5q22.2	adenomatous polyposis coli
<i>ATM</i>	11q22.3	ataxia telangiectasia mutated
<i>BRCA1</i>	17q21	breast cancer 1, early onset
<i>BRCA2</i>	13q13.1	breast cancer 2, early onset
<i>CADM1</i>	11q23	cell adhesion molecule 1
<i>CASR</i>	3q13	calcium-sensing receptor
<i>CD44</i>	11p13	CD44 molecule
<i>CDH13</i>	16q23.3	cadherin 13, H-cadherin
<i>CDK6</i>	7q21.2	cyclin-dependent kinase 6
<i>CDKN2A</i>	9p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>CFTR</i>	7q31.2	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
<i>CHFR</i>	12q24.33	checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase
<i>CREM</i>	10p11.21	cAMP responsive element modulator
<i>ESR1</i>	6q25.1	estrogen receptor 1
<i>GATA5</i>	20q13.33	GATA binding protein 5
<i>GSTP1</i>	11q13	glutathione S-transferase pi 1
<i>IL2</i>	4q27	interleukin 2
<i>KLK3</i>	19q13	kallikrein-related peptidase 3
<i>KLLN</i>	10q23	killin, p53-regulated DNA replication inhibitor
<i>MGMT</i>	10q26	O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase
<i>MLH3</i>	14q24.3	mutL homolog 3
<i>MSH6</i>	2p16	mutS homolog 6
<i>PAH</i>	12q23.2	phenylalanine hydroxylase
<i>PAX5</i>	9p13	paired box 5
<i>PAX6</i>	11p13	paired box 6
<i>PMP22</i>	17p12	peripheral myelin protein 22
<i>PTCH1</i>	9q22.3	patched 1
<i>PTEN</i>	10q23.3	phosphatase and tensin homolog
<i>PYCARD</i>	16p11.2	PYD and CARD domain containing
<i>RARB</i>	3p24.2	retinoic acid receptor, beta
<i>RBI</i>	13q14.2	retinoblastoma 1
<i>STK11</i>	19p13.3	serine/threonine kinase 11
<i>THBS1</i>	15q14	thrombospondin 1
<i>TP53</i>	17p13.1	tumor protein p53
<i>TP73</i>	1p36.3	tumor protein p73
<i>TSC2</i>	16p13.3	tuberous sclerosis 2
<i>VHL</i>	3p25.3	von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
<i>WT1</i>	11p13	Wilms tumor 1

V – Protocolo da técnica de MS-MLPA (Methylation-specific Multiplex Ligation Probe Amplification)

A análise por MS-MLPA inicia-se com a desnaturação de 5µL de DNA no termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durante 5 minutos a 98°C. Após a adição de 3µL de *MLPA buffer* (KCl, Tris-HCl, EDTA, e PEG-600; pH=8,5) e da sonda (*probemix*) a cada amostra, estas são desnaturadas durante 1 minuto a 95°C, permanecendo as sondas a hibridizar durante aproximadamente 15:30 horas a 60°C. Após a hibridização das sondas é adicionado a cada amostra 13µL de água *Nuclease-free* e *Ligase buffer A* (NAD; pH=3,5), à temperatura ambiente. Nesta etapa do procedimento retiram-se 10µL de cada amostra para um segundo tubo, devidamente identificado, onde vai ocorrer a digestão para análise da metilação. A ligação das hemi-sondas ocorre a 48°C durante 30 minutos, após a adição de 10µL de água *Nuclease-free*, *Ligase buffer B* (Tris-HCl, non-ionic detergentes, MgCl₂; pH=8,5) e *Ligase-65* aos primeiros tubos para análise do número de cópias e após a adição de 10µL de água *Nuclease-free*, *Ligase buffer B* e *Ligase-65* e da enzima de restrição HhaI, aos segundos tubos para análise do nível de metilação. A reação da polimerase em cadeia ocorre durante 35 ciclos, com a adição de 5µL de água *Nuclease-free*, *Polymerase* e *PCR Primer Mix* a cada amostra e com volume total de 25µL (30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de emparelhamento a 60°C, 1 minuto de extensão a 72°C, com uma extensão final de 20 minutos a 72°C). A preparação das amostras para a separação das sondas amplificadas requer 0,75µL de produto de PCR, 0,2µL *RoxTM* (Applied Biosystems, Foster City, USA) e 9,2µL de formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, USA). As sondas são depois separadas de acordo com a sua massa e carga por eletroforese capilar e analisadas com auxílio de programas computacionais, como se encontra referenciado anteriormente em materiais e métodos.¹¹⁶

VI – Resultados obtidos das alterações no número de cópias das amostras de tecido tumoral fresco de 30 pacientes com CPCCO, utilizando o painel de sondas ME002. Legenda: ■ - Ganho de material genético; ■ - Perda de material genético.

Região	Gene	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1p36.3	<i>TP73</i>	1,01	0,74	1,08	0,88	1,23	1,02	1,26	0,76	1,00	0,87	1,02	1,02	1,07	0,96	1,05	1,07	0,94	1,11	1,02	0,97	0,95	0,93	1,08	1,01	1,02	1,01	1,08	1,01	1,24	0,98	
2p16	<i>MSH6</i>	0,98	1,34	1,15	1,02	1,12	1,07	1,34	2,44	1,22	1,50	1,09	1,07	1,13	1,08	1,16	0,85	1,13	1,15	1,14	0,98	1,13	1,10	0,86	0,98	1,00	1,12	1,10	1,03	1,24	1,15	
3p25.3	<i>IHL</i>	1,12	0,93	0,91	1,25	1,06	0,96	1,01	0,97	1,09	0,94	0,72	0,88	1,17	1,07	1,07	1,05	1,28	1,04	1,14	0,85	0,82	0,92	0,98	1,08	0,95	0,98	1,25	0,97	1,06	0,87	1,05
3p24.2	<i>RARB</i>	0,80	0,68	0,83	1,15	0,87	0,91	0,88	0,81	0,98	1,13	0,72	0,71	0,71	0,92	0,90	0,88	0,92	0,91	0,98	0,82	0,86	0,92	1,00	1,12	0,90	0,92	0,84	0,99	0,79	0,86	
3q13	<i>CASR</i>	1,00	1,33	1,16	1,03	1,34	1,14	0,86	1,64	1,01	1,43	1,15	1,59	1,04	1,02	1,13	1,16	0,97	1,00	0,95	1,10	1,35	1,34	0,97	1,13	0,95	0,96	1,22	1,03	1,61	0,91	
4q27	<i>IL2</i>	0,62	0,83	1,04	0,94	1,03	1,06	0,79	0,96	1,12	1,03	1,08	1,17	1,03	1,03	1,06	0,76	0,99	0,94	1,05	0,96	0,94	0,93	0,74	0,93	0,82	0,86	1,03	0,86	0,99	1,06	
5q22.2	<i>APC</i>	1,05	0,70	0,91	1,09	0,81	0,96	0,79	0,95	0,91	0,84	0,98	1,00	0,81	1,02	0,89	1,05	0,98	0,91	1,03	0,87	0,79	0,94	0,96	1,01	0,91	0,88	0,99	0,86	0,99	0,98	0,93
6q25.1	<i>ESR1</i>	1,12	0,99	0,98	0,93	0,93	1,02	1,17	0,72	1,00	0,94	1,03	1,02	1,01	1,00	0,76	0,93	1,06	0,96	1,00	0,96	1,00	0,91	0,96	1,12	1,04	0,95	0,82	0,80	0,97	1,12	0,93
7q21.2	<i>CDK6</i>	0,94	1,59	1,05	1,04	1,47	1,02	3,67	1,10	0,94	1,23	1,16	1,61	0,89	0,97	0,88	1,03	1,06	1,13	1,15	0,97	1,11	1,08	1,09	1,09	1,01	1,01	1,53	0,97	1,17	0,98	
7q31.2	<i>CPT1</i>	1,17	1,60	1,05	0,96	1,03	1,02	1,44	1,02	0,92	1,10	0,78	1,28	0,82	1,03	0,93	1,10	0,97	1,02	1,30	0,99	1,08	1,00	1,01	1,00	0,98	1,05	1,17	0,94	1,17	0,95	
9p21	<i>CDKN2A</i>	1,25	0,00	0,89	1,02	0,33	1,04	0,85	1,27	0,50	0,49	1,13	0,98	0,47	1,01	0,76	0,64	0,95	0,95	0,91	0,99	1,00	0,92	1,38	1,04	0,92	0,86	0,46	1,03	0,36	0,81	
9p13	<i>PAX5</i>	0,89	0,77	0,97	0,97	0,85	1,05	0,89	1,33	0,98	0,83	1,14	1,06	0,82	1,11	0,93	1,28	1,10	0,91	0,98	0,98	1,20	0,88	1,15	1,02	0,99	0,93	0,87	0,97	0,99	0,98	
9q22.3	<i>PTCH1</i>	1,12	0,85	1,08	1,05	0,84	0,97	1,00	1,16	0,88	0,88	1,11	1,05	0,81	1,08	0,90	1,22	0,99	1,13	0,97	0,85	1,01	1,02	1,31	1,07	1,00	0,98	1,21	0,98	1,55	1,00	
10p11.21	<i>CREM</i>	0,94	1,09	1,17	0,85	1,03	1,16	1,14	1,22	1,12	1,11	1,12	1,11	1,18	1,04	1,12	0,83	1,13	0,92	0,88	1,04	0,88	1,07	0,82	1,00	1,00	0,95	1,05	0,92	0,88	1,22	
10q23	<i>KLLN</i>	1,07	0,93	0,79	0,93	0,96	0,95	1,12	1,05	1,21	1,14	1,10	1,17	0,98	1,28	1,07	1,19	1,05	1,01	0,88	1,03	0,91	1,04	0,93	1,00	1,03	1,00	1,17	1,01	0,73	0,83	
10q23.3	<i>PTEEN</i>	0,77	0,86	1,08	1,05	0,77	1,08	0,94	0,97	1,01	1,12	1,00	1,14	0,94	0,95	1,04	0,90	1,00	1,00	0,91	0,84	0,93	0,95	0,97	0,89	0,97	0,99	0,98	1,00	0,98	0,78	1,00
10q26	<i>MGMT</i>	0,96	0,73	0,91	0,97	0,97	0,91	0,90	0,95	0,87	0,83	0,81	0,90	0,93	0,93	0,92	1,06	0,88	1,12	0,83	0,96	0,91	0,95	1,05	1,04	0,99	0,97	1,02	1,03	0,78	0,95	
11p13	<i>PAX6</i>	0,91	0,70	0,93	1,00	1,05	1,04	0,74	0,75	1,03	1,07	0,98	0,99	1,02	0,90	0,92	0,92	0,86	0,96	1,00	1,02	0,95	1,01	1,14	1,08	1,09	0,92	0,85	0,97	0,77	0,95	
11p13	<i>WT1</i>	1,23	0,77	1,01	0,96	1,18	1,06	0,78	0,70	0,95	0,90	1,08	0,99	1,02	1,06	0,94	1,03	1,05	1,09	1,01	0,95	1,02	0,85	0,95	1,02	1,00	1,05	1,08	0,81	0,93	0,79	1,03
11p13	<i>CD44</i>	0,98	0,69	0,94	1,18	0,99	1,01	0,82	0,76	0,94	0,93	0,89	1,06	0,98	0,92	1,03	0,89	1,04	0,90	1,01	0,98	1,06	0,99	0,84	1,24	1,11	1,02	0,96	0,88	1,09	0,84	0,94
11q13	<i>GSTP1</i>	1,38	1,43	1,58	0,95	2,77	1,07	2,77	1,91	1,18	1,57	1,53	2,42	1,51	1,32	1,12	0,97	1,09	1,65	1,07	1,28	1,31	1,27	0,97	0,90	1,41	1,20	1,63	1,06	1,59	1,16	
11q22.3	<i>ATM</i> ex 1	0,95	1,12	0,97	1,15	0,94	0,97	1,09	0,89	1,10	0,88	0,83	0,67	0,88	0,91	1,01	0,79	1,08	0,97	1,07	0,98	0,90	1,11	1,02	0,88	0,96	0,94	0,86	1,04	0,81	1,05	
11q23	<i>ATM</i> ex 26	0,76	1,06	1,00	0,96	0,81	1,05	1,04	0,82	1,11	1,01	0,80	0,78	0,94	0,76	1,13	0,60	1,04	0,90	1,03	1,00	1,08	1,21	0,83	0,96	0,95	0,93	0,91	1,02	0,84	1,06	
11q23	<i>CADMI</i>	0,64	1,09	1,01	0,84	0,86	0,98	1,08	0,81	0,99	0,89	0,80	0,76	0,80	0,83	0,95	0,68	0,96	0,83	0,96	0,88	0,95	0,88	1,08	0,83	0,93	0,98	0,83	0,85	0,97	0,78	0,98
12q23.2	<i>PAH</i>	0,99	0,96	0,97	1,03	1,00	1,18	0,78	0,90	0,99	1,15	0,94	1,07	1,02	1,02	1,02	1,02	1,04	1,02	1,01	0,95	0,87	0,99	1,01	1,03	1,01	0,94	1,01	0,91	0,97	0,98	
12q24.33	<i>CHFR</i>	1,12	1,07	1,01	1,13	0,91	1,01	0,99	0,85	0,98	1,12	0,98	1,02	1,07	1,01	1,12	1,05	1,01	1,21	1,06	1,00	0,98	1,08	1,04	0,96	1,01	1,23	1,25	1,10	1,06	1,08	
13q13.1	<i>BRC42</i>	1,07	0,86	0,86	1,11	1,16	1,16	0,90	0,95	1,00	0,99	0,84	0,68	1,08	1,02	0,96	1,07	1,03	0,91	0,96	1,08	0,97	0,93	1,02	0,94	0,88	1,01	0,86	0,98	0,80	0,97	
13q14.2	<i>RBI</i>	0,89	1,37	0,93	1,43	0,86	1,07	0,85	1,08	1,15	0,97	0,66	0,71	1,17	0,97	0,96	0,92	0,98	0,84	0,96	1,06	1,24	1,05	0,95	1,07	0,95	1,04	0,99	1,04	0,88	1,03	
14q24.3	<i>MLH3</i>	1,02	1,35	1,13	0,79	1,06	1,10	0,74	1,31	1,03	1,06	1,16	1,03	1,11	1,38	1,07	0,88	1,41	1,12	1,04	1,37	1,65	1,11	0,85	0,91	1,01	1,23	1,49	0,97	1,36	1,17	
15q14	<i>THBS1</i>	1,04	1,18	0,96	0,80	0,95	0,97	0,98	1,06	0,87	0,83	0,82	1,02	0,99	1,00	0,87	1,07	0,93	0,97	0,89	1,11	0,93	0,99	0,97	1,01	1,06	0,92	1,10	0,98	0,99	0,93	
16p13.3	<i>TSC2</i>	0,96	0,85	1,15	0,83	1,19	0,85	1,28	1,01	1,00	0,87	1,16	0,96	1,08	0,87	1,03	0,97	0,98	1,01	0,99	1,02	1,16	1,10	1,00	0,93	1,12	0,99	0,94	1,04	1,54	1,16	
16p11.2	<i>PYCARD</i>	1,18	0,93	1,37	1,22	1,38	0,96	1,62	1,63	1,20	1,16	1,12	1,02	1,02	1,07	1,24	0,95	1,09	1,09	1,11	1,07	1,23	0,98	0,85	0,84	1,27	0,97	0,92	1,10	1,79	1,32	
16q23.3	<i>CDH13</i>	0,98	0,97	1,00	0,99	1,55	0,96	1,17	0,69	0,93	0,93	1,02	1,26	0,97	0,95	0,86	1,02	0,99	1,02	0,94	1,03	1,08	0,86	0,92	0,86	1,06	1,00	1,01	0,92	1,30	0,92	
17p13.1	<i>TP53</i>	1,13	1,56	1,28	1,07	0,97	0,85	1,49	1,20	1,21	1,44	0,99	1,01	1,04	1,07	1,28	0,94	1,23	1,12	1,04	1,04	1,04	1,36	0,85	0,82	0,93	1,16	1,07	1,02	1,11	1,20	
17p12	<i>PMP22</i>	1,01	1,15	1,11	1,02	0,94	0,90	0,87	0,96	0,86	0,88	0,68	0,84	0,86	1,01	0,99	0,99	0,99	0,99	0,94	1,04	1,01	0,85	0,92	0,86	1,03	1,01	1,10	0,97	1,04	1,02	
17p21	<i>BRC41</i>	1,21	1,64	0,94	0,90	1,27	0,98	1,21	1,31	1,33	1,25	1,29	1,00	1,27	1,17	1,29	1,11	1,19	1,31	1,19	1,03	1,09	1,23	1,06								

VII – Resultados obtidos do padrão de metilação de 25 genes supressores tumorais, de amostras de tecido tumoral fresco dos 30 pacientes com CPCCO, utilizando o painel de sondas ME002. Legenda: □ - genes não metilados (metilação < 25%); ■ - genes metilados (25-50%); ■ - genes hipermetilados (51-100%)

Paciente	TP73	MSH6	VHL	RARB	ESR1	CDKN2A	PAX5	KLLN	MGMT	PAX6	WT1	CD44	GSTPI	ATM	CADMI	CHFR	BRC42	RBI	THBS1	PICARD	CDH13	TP53	BRC41	STK11	GATA5	
1	0	21	0	18	0	0	0	13	0	0	31	0	0	0	27	0	0	0	0	0	14	13	0	0	0	
2	0	6	0	14	0	0	0	0	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	
3	0	7	0	0	7	0	0	0	12	0	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	
4	0	26	0	8	9	0	8	10	8	0	9	0	0	14	0	0	0	0	9	0	7	23	0	0	0	
5	0	7	0	8	0	0	4	4	0	0	64	32	0	0	0	0	0	0	5	0	4	0	0	0	8	
6	18	12	8	24	16	0	13	6	7	0	43	0	0	10	0	0	14	0	6	0	10	0	43	0	24	
7	0	24	0	0	0	0	55	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	39	
8	0	22	0	0	32	0	6	9	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	6	0	0	0	0	0	7	
9	5	43	0	40	18	0	10	11	12	35	65	13	5	7	0	0	0	0	6	14	9	5	0	0	11	
10	0	17	0	7	7	0	0	5	0	14	74	0	0	0	0	0	0	0	8	0	14	0	0	0	17	
11	0	7	0	0	5	0	6	4	19	0	66	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	14	
12	0	17	0	42	31	0	40	0	0	12	79	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	63	
13	0	19	0	6	6	0	7	0	0	0	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	8	10	0	23	45	0	0	0	0	16	44	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	
15	5	22	0	10	7	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	11	
16	0	40	0	29	36	0	13	27	9	0	48	0	0	0	24	0	0	0	10	0	7	0	0	0	36	
17	10	15	0	30	16	0	23	9	0	10	39	54	0	0	0	0	0	0	0	0	10	9	0	0	29	
18	0	20	0	0	6	0	6	12	48	0	16	0	0	0	0	0	0	0	5	0	8	6	0	0	7	
19	0	19	0	0	0	0	34	9	0	21	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
20	16	12	0	0	15	0	30	5	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	13	
21	11	10	0	26	23	0	34	4	0	0	77	0	0	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
22	5	9	0	18	8	0	4	3	9	0	27	0	6	0	0	0	0	0	8	0	18	4	0	0	17	
23	5	41	0	7	10	0	47	23	12	0	15	0	0	0	0	0	0	0	14	0	12	0	0	0	19	
24	14	16	0	13	5	0	81	9	6	0	78	0	0	26	0	37	0	0	5	0	0	0	0	0	14	
25	7	19	0	10	9	0	7	9	4	0	51	0	0	8	7	0	0	0	10	0	15	0	0	0	17	
26	7	27	0	9	11	0	10	16	6	0	53	0	0	0	0	0	0	0	8	0	9	0	0	0	23	
27	6	15	0	19	17	0	6	10	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	18	
28	4	20	0	0	4	0	7	12	4	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	5	0	0	0	7	
29	0	13	0	36	6	0	37	8	0	0	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	8	0	0	7	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

VIII – Comparação dos resultados obtidos no padrão de metilação das amostras de tecido fresco (F) e incluído em parafina (P) de dez pacientes.

Legenda: □ - genes não metilados (metilação ≤ 25%); ■ - genes metilados (metilação de 26-100%).

	TP73	MSH6	VHL	RARB	ESR1	CDKN2A	PAX5	KLLN	MGMT	PAX6	WT1	CD44	GSTP1	ATM	CADMI	CHFR	BRCA2	RBI	THBS1	PYCARD	CDHI3	TP53	BRCA1	STK11	GAT45
1	F	0	21	0	18	0	0	13	0	0	31	0	0	0	27	0	0	0	0	0	14	13	0	0	0
	P	23	32	0	17	10	10	17	10	0	38	0	0	0	24	0	4	6	13	0	7	7	0	0	18
7	F	0	24	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	39
	P	10	22	0	6	7	11	5	12	6	12	0	0	0	9	0	4	6	8	0	6	10	0	0	0
9	F	5	43	0	40	18	10	11	12	35	65	13	5	7	0	0	0	0	8	14	9	5	0	0	11
	P	0	27	0	0	0	0	14	0	28	82	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	13	0	0	0
11	F	0	7	0	0	5	6	4	19	0	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
	P	9	33	0	10	13	8	22	18	0	51	5	0	0	13	0	6	0	19	0	11	9	4	9	18
12	F	0	17	0	42	31	0	0	0	12	79	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	63
	P	0	23	0	17	9	13	16	11	18	43	0	0	0	0	0	9	0	9	0	6	12	0	0	42
14	F	8	10	0	23	45	0	0	0	16	44	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38
	P	11	27	0	25	51	6	14	8	25	46	0	0	0	28	0	5	0	11	0	6	7	0	0	48
16	F	0	40	0	29	36	13	27	9	0	48	0	0	0	0	0	0	0	10	0	7	0	0	0	36
	P	11	26	0	31	34	8	15	6	0	49	0	0	0	0	0	4	0	11	0	6	6	0	0	39
25	F	7	19	0	10	9	7	9	4	0	51	0	0	0	8	7	0	0	10	0	15	0	0	0	17
	P	11	30	0	11	11	9	17	10	0	31	0	0	2	0	0	7	0	12	0	13	8	0	0	18
26	F	7	27	0	9	11	10	16	6	0	53	0	0	0	0	0	0	0	8	0	9	0	0	0	23
	P	12	24	0	8	6	6	16	9	0	31	0	0	0	0	0	5	0	8	0	13	7	0	0	0
28	F	4	20	0	0	4	7	12	4	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	5	0	0	0	7
	P	0	22	0	7	0	0	15	0	0	15	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0