Caique Fernandes de Souza

Validação do envolvimento dos genes *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8*
por RT-PCR quantitativa em tempo real em carcinomas epidermóides de
cabeça e pescoço

Expression analysis of *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* and *KLK8* genes by quantitative real
time RT-PCR in head and neck squamous cell carcinomas

São Paulo

2010

Caique Fernandes de Souza

Validação do envolvimento dos genes *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8*
por RT-PCR quantitativa em tempo real em carcinomas epidermóides de
cabeça e pescoço

Expression analysis of *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* and *KLK8* genes by quantitative real
time RT-PCR in head and neck squamous cell carcinomas

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Eloiza Helena Tajara da
Silva

São Paulo

2010

Fernandes de Souza, Caique
Validação do envolvimento dos gene KRT6A, KRT19, MSLN e KLK8 por
RT-PCR quantitativa em tempo real em carcinomas epidermóides de
cabeça e pescoço
113 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Expressão gênica. 2. Carcinomas epidermóides de cabeça e
pescoço.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva
Orientadora

À Deus

À minha família

Ao meu avô Benedito (*in memoriam*)

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

(Amyr Klink)

Agradecimentos

À minha orientadora, Eloiza Helena Tajara da Silva, por me aceitar como orientado e acreditar em mim. Sempre esteve presente nos momentos de dificuldade, mostrando todos os caminhos possíveis para superá-los. Sua sabedoria, paciência e dedicação são um exemplo para todos. Muito obrigado por essa oportunidade!

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – IB/USP, por me propiciar uma excelente formação científica.

Aos coordenadores e funcionários do programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências da USP, e em especial a Deisy Santos de Moraes, pela competência e disposição, auxiliando sempre que necessário.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), por oferecer a estrutura necessária para realizar esse trabalho.

Aos pesquisadores do grupo GENCAPO (Head and Neck Genome Project), responsáveis pela coleta das amostras biológicas e respectivas análises patológicas, além de disponibilizarem os dados dos pacientes.

Ao Dr. Breno Gutierrez Motta, por gentilmente ceder as amostras de cavidade oral normais para o cultivo de queratinócitos.

Aos pacientes, que voluntariamente doaram as amostras para a pesquisa científica.

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bionformática Médica (LMMBM) pela amizade, carinho, vivência, compreensão. Agradeço à Flávia, Ulises, Flávio, Tiago, Rodrigo, Giovana, Fernanda, Bianca, Natália, Juliana, Jaqueline e Alessandra.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro.

Aos meus grandes amigos Pierre, Felipe Knappe e Shester Carlos, por sempre estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Aos meus pais Luiz Carlos de Souza e Telma Sumara Fernandes das Neves de Souza por todo o cuidado, carinho, dedicação, compreensão e amor com que me criaram. Agradeço por toda a vida pelos ensinamentos e conselhos, pela palavra amiga que vocês me deram nos momentos difíceis e pela ajuda para tomar as decisões em minha vida. EU AMO VOCÊS!

À minha avó Rosa Kantowitz de Souza e a minha tia Maria Magdalena de Souza por todo apoio que me deram e fizeram com que fosse possível a concretização de mais essa etapa em minha vida.

Sumário

4

INTRODUÇÃO.....	1
Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço	1
Queratinas	6
Mesotelina	10
Calicreína 8.....	11
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
Casuística	15
Metodologia	19
Cultura de Linhagens Celulares.....	19
Cultura Primária de Queratinócitos.....	20
Curvas de Proliferação Celular para Padronização da Camada de Sustentação	21
Extração de RNA	22
Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa (RT-PCR)	22
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	23
Determinação da Eficiência dos Iniciadores	26
Cálculo da Expressão Relativa dos Genes <i>KRT6A</i> , <i>KRT19</i> , <i>MSLN</i> e <i>KLK8</i>	26
Análise Estatística	27
RESULTADOS	28
Casuística	28
Curvas de Proliferação Celular para Padronização da Camada de Sustentação	28
Padronização da Cultura Primária de Queratinócitos.....	28
Curvas-Padrão.....	31
Linhagens Celulares	33
Seleção do Padrão Interno para Tumores Primários	36
Expressão do gene <i>KRT6A</i>	37
Expressão do gene <i>KRT19</i>	39
Expressão do gene <i>MSLN</i>	41
Expressão do gene <i>KLK8</i>	43
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	53
RESUMO	54
ABSTRACT.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
Anexo 1.....	68
Anexo 2.....	85
Apêndice.....	98

INTRODUÇÃO

Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço

Os tumores de cabeça e pescoço compreendem processos malignos que ocorrem em uma variedade de sítios do trato aéreo-digestivo superior, incluindo cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas ou epidermóide (CECP). Esses carcinomas são clinicamente heterogêneos e resultam do acúmulo de mutações somáticas em genes que regulam o crescimento, a proliferação e a morte celular, consequentemente levando a alterações na função dos seus produtos (Ha *et al.*, 2009). Existem evidências de que mudanças epigenéticas também estão relacionadas com a tumorigênese de cabeça e pescoço porque podem conferir vantagens proliferativas para a célula (Calmon *et al.*, 2009).

É estimada uma incidência anual de aproximadamente 500 mil novos casos de CECP no mundo e aproximadamente 300 mil óbitos (Globocan 2002, <http://www-dep.iarc.fr/>; Parkin *et al.*, 2005). Apesar da incidência elevada em alguns países desenvolvidos, como a França (Moriniere, 2006), a taxa de mortalidade é menor do que em países em desenvolvimento (Ferlay *et al.*, 2002). Esse fato é dependente do sub-sítio anatômico afetado, que por sua vez está relacionado com fatores etiológicos regionais (Parkin *et al.*, 2005). Em alguns países, como nos Estados Unidos, a incidência de CECP da maioria dos subsítios está decrescendo gradualmente, comparando-se os dados de 1975 a 2007 (Altekruse *et al.*, 2009), provavelmente em decorrência de diagnósticos mais precoces. No Brasil, são esperados cerca de 14 mil novos casos em 2010, considerando somente os de cavidade oral (Ministério da Saúde, 2009), o que representa a maior taxa de incidência desse sub-grupo em países com renda média-alta (Cancela *et al.*, 2009).

Os CECPs compreendem um importante problema de saúde pública porque aumentam significativamente a morbidade e a mortalidade dos afetados (Gilbert, 2008). A taxa geral de sobrevida de 5 anos para os pacientes está entre as mais baixas quando comparada a outros tipos de câncer (Dasgupta *et al.*, 2006), apesar do progresso significativo que ocorreu nos últimos anos em diagnóstico, tratamento local e regimes terapêuticos direcionados para essa doença.

A etiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço é complexa, mas os fatores de risco principais são o uso de tabaco e o consumo de álcool (Hunter *et al.*, 2005; Hashibe *et al.*, 2009). Rodriguez e colaboradores (2004) verificaram um valor de odds ratio (OR) de 20,7 para câncer de cavidade oral e faringe em fumantes com consumo superior a 25 cigarros/dia. Os autores também encontraram valores OR entre 1 e 5 para etilistas, proporcional à quantidade de álcool consumida. O efeito combinado dos dois fatores

resultou em um aumento na OR de cerca de 48 vezes, diretamente relacionado ao nível de tabaco e álcool. Uma conclusão similar foi obtida por Hashibe *et al.* (2009).

O risco de câncer de cavidade oral também é elevado para outros tipos de tabagismo. Em comunidades da Índia e Indonésia, por exemplo, onde a população masca “*betel quid*”, tabaco e sementes do betel (*Areca catechu*) embrulhados na folha do betel, a incidência desse câncer está elevada (revisto por Hunter *et al.*, 2005).

A interrupção do hábito de fumar mostra uma importante redução de riscos de tumores de cabeça e pescoço e de outros tumores do trato aerodigestivo superior, com valores cumulativos aos 75 anos iguais a 6,3% para controles fumantes, e 3,1% ou 1,2% para aqueles que pararam de fumar aos 50 ou aos 30 anos de idade, respectivamente (Bosetti *et al.*, 2008; Marron, 2010).

Os carcinógenos produzidos pelo tabaco, como o benzo(a)pireno e as nitrosaminas, produzem tipos característicos de transversão do nucleotídeo guanina em genes cruciais envolvidos no desenvolvimento dos CECPs, como o *TP53* (Brennan *et al.*, 1995). No caso do álcool, a carcinogênese de cabeça e pescoço parece ser mediada pelo seu produto de metabolização, o acetaldeído, que pode causar danos ao DNA (Balbo *et al.*, 2008) e seqüestrar glutathione, um peptídeo importante na destoxicação de carcinógenos. O álcool também pode induzir a enzima CYP2E1, que está envolvida na ativação de vários pró-carcinógenos encontrados em bebidas alcoólicas e no tabaco (revisto por Hunter *et al.*, 2005).

Zhang e colaboradores (1999) verificaram um aumento do risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço em usuários de maconha (*Cannabis sativa*), com uma relação dose-resposta para frequência e duração. Essa associação foi independente de idade, sexo, raça, educação, consumo de álcool e fumo. Resultados contrários a esses foram relatados por vários autores, avaliando diferentes sub-sítios anatômicos (Llewellyn *et al.*, 2004; Rosenblatt *et al.*, 2004; Hashibe *et al.*, 2006; Aldington *et al.*, 2008). O consórcio INHANCE (International Head and Neck Cancer Epidemiology, <http://inhance.iarc.fr/studies.php>), coordenado pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC), fez uma revisão de 18 estudos individuais do tipo caso-controle em câncer de cabeça e pescoço, dos quais cinco continham informações sobre o uso de maconha. Com um total de 4085 pacientes e 5125 controles, a análise agrupada dos casos também não detectou uma associação significativa entre o consumo freqüente de maconha e o risco desse câncer (Berthiller *et al.*, 2009).

Em relação a outros fatores de risco, os dados da literatura indicam o envolvimento do papilomavírus humano (HPV) na etiologia dos CECPs, primeiramente proposto por Syrjanen *et al.* (1983) e recentemente confirmado por vários trabalhos (Herrero *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Kreimer *et al.*, 2005; D'Souza *et al.*, 2007), especialmente para os tumores de

orofaringe. Os CECPs HPV-positivos aparentemente formam um grupo à parte dos demais CECPs, com menores taxas de recorrência e maior sobrevida (Smith *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009; Sedaghat *et al.*, 2009).

A transformação maligna das células epiteliais da cavidade oral por HPVs oncogênicos ou de alto risco, como os tipos 16 e 18, depende da atuação de suas proteínas E6 e E7 (Chow *et al.*, 2010). A oncoproteína E6 interage com a supressora tumoral p53 e dirige sua degradação mediada pelo proteassomo, recrutando a ligase E6AP. Da mesma forma, a oncoproteína E7 liga-se e promove a degradação da proteína retinoblastoma (pRb), impedindo sua interação com o fator de transcrição E2F e, portanto, promovendo a progressão do ciclo celular (Pim *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010; Pim e Banks, 2010). Assinaturas genéticas de carcinomas epidermóides de orofaringe mostraram-se diferentes quando comparados tumores HPV-positivos e HPV-negativos, além de alterações cromossômicas distintas entre os dois tipos, refletindo possíveis diferenças do desenvolvimento e da progressão do tumor (Klussmann *et al.*, 2009).

Uma associação positiva com risco de CECP foi também encontrada para má higiene bucal e perda de dentes, independentemente do consumo de álcool ou tabaco (Guha *et al.*, 2007; Hiraki *et al.*, 2008), o que sugere a ligação de infecções bacterianas crônicas com a patogênese desse câncer (Curado e Hashibe, 2009). Em relação à dieta, assim como ocorre para outros tipos de tumor, foi observada uma associação inversa entre o total de frutas e vegetais ingeridos e o risco da doença (Boeing *et al.*, 2006; Freedman *et al.*, 2008; Sapkota *et al.*, 2008).

Outros fatores de risco para carcinomas de cabeça e pescoço incluem polimorfismos em enzimas que metabolizam tabaco e álcool (Hashibe *et al.*, 2006; Sturgis e Wei, 2002), história familiar (Suarez *et al.*, 2006; Negri *et al.*, 2009) e síndromes de susceptibilidade ao câncer, como Li-Fraumeni, Lynch-II, anemia de Fanconi e ataxia telangectasia (Trizna e Schantz, 1992; Foulks *et al.*, 1996).

Atualmente, algumas variáveis clinicopatológicas são utilizadas para prognóstico de pacientes com CECP, como tamanho do tumor ao diagnóstico, presença de metástases em linfonodos e grau de diferenciação da lesão, o que é frequentemente insuficiente para prever desfecho clínico. Tem sido sugerido que o status da margem cirúrgica, geralmente avaliado por análise histológica, pode ter também valor prognóstico, tanto para recorrência como para metástase à distância (Martone *et al.*, 2007). Entretanto, a recorrência local pode ser observada em pacientes com margens negativas, reforçando a hipótese proposta por Slaughter e colaboradores (1953) de cancerização de campo e de tecido histologicamente alterado ao redor do carcinoma como causa de falha no tratamento.

As decisões sobre tratamento em CECP são geralmente complexas e dependem de vários especialistas, incluindo cirurgiões de cabeça e pescoço e cirurgiões plásticos,

oncologistas, radiologistas e dentistas. O sítio primário do tumor, seu estadiamento e outros fatores, como preservação do órgão e da deglutição, são utilizados para guiar a escolha da melhor conduta que, em geral, envolve cirurgia e radioterapia (Argiris *et al.*, 2008).

Recentemente, alguns marcadores derivados de análises moleculares têm sido identificados e empregados com benefícios clínicos, como os inibidores do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Karamouzis *et al.*, 2007; Argiris *et al.*, 2008). As mudanças no perfil de expressão gênica são potencialmente úteis para detecção precoce e avaliação de agressividade (Hunter *et al.*, 2005) e, se identificadas na fase pré-operatória, também para definição de um tratamento apropriado para o paciente (Gollin, 2001). Entretanto, poucos marcadores moleculares são conhecidos que apresentam características de sensibilidade e especificidade para diagnóstico ou prognóstico em CECP. O entendimento das vias moleculares envolvidas na iniciação e na progressão desses tumores é, portanto, muito importante para o conhecimento de sua biologia e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de abordagens preventivas e terapêuticas eficazes.

Sob uma perspectiva genética, a progressão dos carcinomas de cabeça e pescoço tem sido descrita com alterações e padrões específicos que levam à transformação maligna (Ha *et al.*, 2003). O modelo mais conhecido foi proposto por Califano e colaboradores (1996) e inclui inativação de genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogenes, que ocorrem durante o desenvolvimento do processo neoplásico, desde lesões hiperplásicas benignas até displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Os estudos moleculares têm continuamente acrescentado novos elementos ao modelo de Califano, incluindo mudanças epigenéticas e do microambiente tumoral (Argiris *et al.*, 2008) (Figura 1).

Entre as principais alterações que ocorrem na transformação da mucosa normal, está a reativação da telomerase, uma ribozima envolvida na manutenção dos telômeros e na imortalização das células, descrita em 90% dos casos de CECP e em lesões pré-malignas (McCaul *et al.*, 2002). A perda de segmentos das regiões cromossômicas 9p21 bem como a perda de 3p, as mutações de ponto no gene *TP53* e a inativação do gene *CDKN2A* (*p16/p14*), por deleção homozigótica, mutações de ponto ou metilação do promotor, compreendem os eventos precoces da tumorigênese de cabeça e pescoço (Mao *et al.*, 1996; Rocco e Sidransky, 2001; Balz *et al.*, 2003; Perez-Ordenez *et al.*, 2006). As amplificações da banda 11q13 na forma de regiões homogeneamente coradas e o aumento de expressão da ciclina D1 também são detectados em CECP e têm sido correlacionados com um comportamento tumoral mais agressivo (Pignataro *et al.*, 1998; Capaccio *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2008).

Figura 1. Evolução fenotípica e alterações moleculares que ocorrem na tumorigênese de cabeça e pescoço, segundo revisão de Argiris *et al.* (2008).

O aumento de expressão da proteína EGFR, observado em 90% ou mais dos casos de CECP, está associado com pior prognóstico (Rubin *et al.*, 1998). Esse receptor inicia uma cascata de sinalização após interação com seu ligante e consequente dimerização, e ativa vias que regulam proliferação celular, apoptose, invasão e angiogênese (Karamouzis *et al.*, 2007). Mais recentemente, surgiram evidências de que alguns microRNAs, entre eles miR-21, miR-184, miR-133a/133b, miR-137, and miR-193a, participam do desenvolvimento de CECPs, atuando em processos celulares como diferenciação, proliferação e apoptose (Chang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Essas pequenas moléculas de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos regulam a expressão gênica pós-transcricional ligando-se à região 3' não traduzida de mRNAs alvos e, quando em níveis alterados, podem afetar diferentes vias de sinalização.

Como pode ser deduzido do exposto acima, os tumores de cabeça e pescoço exibem muitas alterações genéticas. Várias técnicas de análise de amplo alcance têm fornecido uma lista crescente de biomarcadores potenciais. Entre essas técnicas, estão a de *microarray* de cDNA e de análise serial de expressão gênica (SAGE), ambas capazes de analisar a expressão de milhares de genes simultaneamente.

Os dados de *microarrays* utilizando amostras de CECP têm revelado muitas alterações que permitem, por exemplo, distinguir tumores metastáticos de não-metastáticos (Roepman *et al.*, 2005) e revelar um perfil distinto mesmo entre lesões de subsítios muito próximos (Severino *et al.*, 2008). Esses resultados podem auxiliar a escolha de um tratamento adequado para os pacientes, assim como antecipar a progressão da doença.

Em um estudo prévio de nosso grupo, Silveira *et al.* (2008) avaliaram dados de SAGE em carcinomas de laringe com o objetivo de identificar eventos envolvidos no desenvolvimento de CECPs. Foram construídas duas bibliotecas, uma a partir de tumor com metástase em linfonodos regionais e outra de tumor sem evidência de metástases, além de uma biblioteca gerada de um *pool* de amostras de margens cirúrgicas. Sua análise estatística de aproximadamente 54 mil tags revelou conjuntos de tags diferencialmente expressas em tumor versus tecido normal e em carcinoma metastático versus não metastático. Entre os 60 genes com valores mais discriminativos, estavam os das queratinas 6A (*KRT6A*) e 19 (*KRT19*), da mesotelina (*MSLN*) e da calicreína 8 (*KLK8*).

Queratinas

As queratinas são proteínas do grupo dos filamentos intermediários presentes nas células epiteliais de vertebrados (revisto por Bragulla e Homberger, 2009). As análises genômicas recentes têm revelado 13 pseudogenes e 54 genes funcionais das queratinas, 28 do tipo I ou acídicas (K9–K23) e 26 do tipo II ou básico-neutras (K1–K8), mapeados em duas regiões cromossômicas 17q21.2 e 12q13.13, respectivamente, com exceção do gene

da K18 que está localizado no cromossomo 12 (Schweizer *et al.* 2006). A unidade mais simples dessas proteínas é um tetrâmero com dois dímeros antiparalelos; cada dímero formado por uma molécula de queratina do tipo I e uma do tipo II (Figura 2).

Figura 2. Esquema da molécula de queratina mostrando o alinhamento de heterodímeros I / II e a formação de tetrâmeros (modificado de Bragulla e Homberger, 2009).

As 54 queratinas são divididas em duas categorias, as epiteliais e as queratinas de cabelo (Schweizer *et al.*, 2006). Sua função está relacionada com manutenção da estrutura epitelial, proteção contra traumas mecânicos e, possivelmente, comunicação entre células adjacentes ou componentes do citoplasma (Ishida-Yamamoto *et al.*, 2002; Oshima, 2002).

Magin *et al.* (2007) também propuseram uma função regulatória para as citoqueratinas, bem como seu envolvimento em vários aspectos do comportamento celular, como migração, diferenciação e proliferação. Seus argumentos se baseiam no fato de que a reorganização dos filamentos intermediários de queratina em resposta a sinais extra e intracelulares depende de sua fosforilação em resíduos de serina, o que resulta na geração de grânulos e aumento de um pool solúvel de oligômeros. Essa fosforilação cria ao mesmo tempo sítios de ligação para as proteínas adaptadoras 14-3-3 (Ku *et al.*, 1998) que, dependendo da queratina, leva à regulação de síntese protéica via cascata de mTOR (Kim *et al.*, 2006) ou à progressão do ciclo celular (Margolis *et al.*, 2006).

Uma ampla gama de doenças de epitélio tem sido associada com mutações nos genes das queratinas. Em geral essas doenças são causadas por mutações dominante-negativas, a maioria delas do tipo *missense* ou com pequenas deleções ou inserções que mudam a matriz de leitura, e são caracterizadas por fragilidade do tecido afetado e, em alguns casos, por hiperplasia (Omary *et al.*, 2004).

Nas neoplasias, as queratinas possuem um papel importante em migração celular, invasão e metástase. Sua expressão alterada e/ou desequilíbrio do pareamento das queratinas do tipo I e II podem resultar em resistência a drogas, reparo tecidual deficiente,

aumento de diferenciação e sobrevivência celular ou apoptose, além de ativação de vias de transdução de sinal responsáveis pela progressão da doença (Bambang *et al.*, 2009).

Em condições de injúria, a transcrição dos genes das queratinas 6, 16 e 17 é induzida, enquanto a expressão do gene da queratina 10 é reduzida, provavelmente para garantir à célula um citoesqueleto que favoreça a migração para o local da lesão (Paladini *et al.*, 1996; Wong e Coulombe, 2003). Os dados de Trost *et al.* (2010) adicionam uma informação importante a essa questão. Seu estudo concluiu que um desequilíbrio nas proporções do heterodímero K6/K16 reduz o potencial migratório dos queratinócitos bem como a capacidade de regeneração pós-injúria. Esse achado possui importantes implicações para o entendimento de processos de envelhecimento, que mostram perda dessa capacidade, e de doenças neoplásicas, nas quais a migração é uma característica de fenótipos agressivos.

Além de situações de injúria, as K6, K16 e K17 também são alteradas em várias doenças crônicas que afetam a pele, incluído psoríase, carcinomas, infecções, dano induzido por luz ultra-violeta e condições inflamatórias (Trost *et al.*, 2010). Por exemplo, mutações nos genes das citoqueratinas 6a (*KRT6A*) ou 16 (PC tipo-1, OMIM 167200) e nas citoqueratinas 6b ou 17 (PC tipo-2, OMIM 167210) resultam na doença Paquioniquia Congenita (PC), um distúrbio genético bem caracterizado que afeta principalmente as unhas e a pele e cujos principais sintomas incluem unhas extremamente espessas e queratose palmoplantar (Smith *et al.*, 2006). Recentemente, Hickerson *et al.* (2009) verificaram que a rampamicina inibe seletivamente o *KRT6A* em queratinócitos humanos e promove uma melhoria nos sintomas dessa doença. De modo inverso, a interleucina-1 causa mudanças no citoesqueleto de queratinócitos epidermóides humanos por meio da indução de expressão da queratina 6 (Komine *et al.*, 2001). O hormônio da tireóide T3 possui efeito similar e parece induzir a proliferação de queratinócitos e cicatrização, estimulando a expressão de K6A bem como de K16 e K17 (Safer *et al.*, 2004).

A queratina 6 e seus parceiros K16 e 17 são observados em epitélio estratificado, tais como os de língua e palato, bem como nas células suprabasais da epiderme plantar e palmar, da unha e da bainha externa do folículo piloso (Takahashi *et al.*, 1995; Barak *et al.*, 2004; Bragulla e Homberger, 2009). Existem três variantes da queratina 6, cada uma codificada por seu próprio gene: *KRT6A*, *KRT6B* e *KRT6C*, cujos RNAs são traduzidos em diferentes produtos por *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais (Schweizer *et al.*, 2006). A função da variante 6A, como pode ser deduzido do exposto acima, está relacionada com reparo e repopulação de queratinócitos (Van der Velden *et al.*, 1999; Chou e Goldman, 2000). O estudo de Schmelz *et al.* (2005) sugere que células KRT6A+ de próstata são candidatas a células-tronco desse tecido.

Em câncer, já foi observada a redução de níveis das queratinas 5 e 6 (*K5/6*) em carcinomas perianais (Lisovsky *et al.* (2007). Em câncer de mama, por outro lado, sua

expressão e/ou do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) parece favorecer um pior prognóstico (Tischkowitz *et al.*, 2007). No grupo de tumores de cabeça e pescoço, os dados são escassos. Entretanto, o papel das citoqueratina 6 nesses casos pode ser previsto considerando os resultados obtidos com camundongos K6 ou K6A/6B nulos, que mostram alterações específicas da mucosa oral (Wong *et al.*, 2000; Wojcik *et al.*, 2001).

Ao contrário da queratina 6, a K19 é expressa geralmente em epitélio simples, pseudo estratificado. Essa proteína forma filamentos intermediários com K8, K5 e K7 (revisto por Bragulla e Homberger, 2009). Na maioria dos tumores epiteliais, apresenta expressão elevada, como em carcinoma hepatocelular (Uenishi *et al.*, 2003), câncer de mama (Parikh *et al.*, 2008) e pulmão (Chen *et al.*, 2007) e em tumores endócrinos pancreáticos (Schmitt *et al.*, 2007).

Como algumas outras queratinas, a K19 pode ser liberada das células tumorais em diferentes fluidos corporais. Em indivíduos saudáveis, o nível de queratinas na circulação é baixo, ao contrário dos pacientes com carcinomas epiteliais (Barak *et al.*, 2004). Em função dessa característica, a K19 ou seu RNA são utilizados como marcadores de micrometástases na medula óssea (Ozbas *et al.*, 2003; Vincent-Salomon *et al.*, 2007), na corrente sanguínea (Ignatiadis *et al.*, 2007, 2008; Xenidis *et al.*, 2006; Stathopoulou *et al.*, 2002) e em linfonodos de pacientes com CECp (Xu *et al.*, 2008) ou com outros carcinomas (Saintigny *et al.*, 2005).

Essas células tumorais disseminadas podem sobreviver em um estado dormente por períodos prolongados, até que sejam reativadas e colonizem os órgãos alvo. Bambang *et al.* (2009) observaram que a queratina 19 é um importante modulador desse estado de dormência, capaz de reprogramar o ciclo celular e modular vias de sinalização e, portanto, de contribuir para a sobrevivência da célula tumoral.

Na mucosa oral normal ou hiperplásica, a K19 é somente detectada na camada basal (Zhong *et al.*, 2007). Em carcinomas epidermóides de cavidade oral, sua presença é observada na mucosa com displasia ou no carcinoma in situ, tanto na camada basal como suprabasal (Lindberg *et al.*, 1989). Uma ampla faixa de frequência desses tumores positivos para expressão da proteína é relatada na literatura, desde 29% (Vora *et al.*, 2003) ou 67% (Hamakawa *et al.*, 1998) dos carcinomas estudados até 100% de casos com marcação positiva (Nie *et al.*, 2002). No nível de mRNA, Zhong *et al.* (2007) também observaram aumento de expressão nos carcinomas orais e os dados permitiram a detecção de uma correlação significativa com o grau de diferenciação, sendo os tumores menos diferenciados aqueles com maiores níveis de transcritos.

Vários fatores extracelulares induzem a expressão dos genes das queratinas quando ligados aos seus receptores nas membranas de queratinócitos. Por exemplo, o fator de necrose tumoral 1 ativa o gene da K6 (revisto por Bragulla e Homberger, 2009). Efeito

similar sobre os genes de K6, K16 ou K17 é observado para interleucina-1, fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento transformante. Sob a ação do ácido retinóico, os níveis de K6 e K17 diminuem e os de K19 aumentam.

Os mecanismos que regulam a expressão de *KRT19* em câncer parecem ser dependentes do contexto celular e tecido-específicos (Bambang *et al.*, 2009). Por exemplo, em câncer de mama, sua expressão é regulada por estrógenos (Choi *et al.*, 2000) e já foi associada com a sinalização do HER-2/neu (Zhang *et al.* 2005). Em câncer pancreático, essa regulação é realizada pelo fator Kruppel-like GKLF/KLF4 e pelo Sp1 (Brembeck e Rustgi, 2000).

Mesotelina

A mesotelina é um antígeno de diferenciação cuja expressão em tecidos normais está restrita a células mesoteliais que limitam a pleura, o pericárdio e o peritônio. O gene da mesotelina (*MSLN*) está localizado em 16p13.3 e codifica uma proteína precursora de 71 kDa, cuja porção amino origina a citocina secretada conhecida como fator de potencialização de megacariócito - MPF (Kojima *et al.*, 1995) e um fragmento de 40kD, a mesotelina, que é ligado à membrana por glicosil-fosfatidilinositol (revisto por Hassan e Ho, 2008) (Figura 3).

O aumento de expressão do gene *MSLN* já foi observado em vários tumores, como câncer pancreático, de ovário e mesotelioma (Chang e Pastan, 1996), bem como em câncer de cabeça e pescoço, vulva, endométrio, pulmão, fígado e esôfago (Chang *et al.*, 1992; Ordonez, 2003; Miettinen e Sarlomo-Rikala, 2003).

Em uma análise de sequências genômicas ao redor do gene *MSLN*, Hucl *et al.* (2007) descobriram um elemento estimulador modular (*enhancer*), responsável pelo aumento de níveis câncer-específicos da mesotelina. A atividade desse elemento foi dependente da ligação de um de seus sítios ativos, o MCAT, ao fator de transcrição TEF-1.

Figura 3. Esquema do produto do gene *MSLN* mostrando o precursor de 622 aminoácidos e as regiões que originam os dois produtos MPF e MSLN (modificado de Hassan e Ho, 2008).

A elevada expressão da mesotelina em algumas neoplasias humanas e sua limitada expressão nos tecidos normais somadas à existência de formas relacionadas solúveis, como o MPF, permitem métodos de diagnóstico e imunoterapia. Além disso, a presença de anticorpos específicos para a proteína em uma parcela significativa de pacientes abre a possibilidade de desenvolvimento de vacinas. Vários protocolos relacionados com essas terapias estão em andamento (Ho *et al.*, 2005; Hassan e Ho, 2008; Uehara *et al.*, 2008).

O entendimento da função biológica da mesotelina é ainda incompleto, especialmente porque camundongos *knockout* para o gene não exibem anomalias anatômicas ou histológicas em qualquer dos tecidos nos quais está normalmente expressa (Bera e Pastan, 2000). Recentemente, Uehara *et al.* (2008), avaliando linhagens celulares de câncer de mama, mostraram que o aumento de expressão de *MSLN* está implicado na promoção de crescimento independente de ancoragem. Esse achado é concordante com os dados sobre a ligação da mesotelina com a mucina 16 (ou CA125) e uma provável estimulação e disseminação de células neoplásicas (Gubbels *et al.*, 2006). Outros estudos *in vitro* também revelaram que a mesotelina é induzida pela via de sinalização do Wnt, responsável pela regulação de uma variedade de processos biológicos, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Prieve e Moon, 2003).

Em relação à proliferação celular, Bharadwaj *et al.* (2008) verificaram que níveis elevados da mesotelina promovem a ativação do fator de transcrição Stat3, o que leva ao aumento de expressão da ciclina E e de complexos ciclina E/quinase CDK2 e à indução da transição G1-S.

Calicreína 8

As calicreínas são serino-proteases codificadas, na espécie humana, por 15 genes localizados em tandem, especificamente em 19q13.4, com 5 exons codificadores similares (Yousef e Diamandis, 2001). Seu transcritoma é amplo, com mais de 50 isoformas geradas por *splicing* alternativo. Todos os genes das calicreínas humanas são traduzidos em pré-proenzimas, que são clivadas para proenzimas. Após secreção, são processadas por proteases ou mesmo por calicreínas e tornam-se enzimas extracelulares ativas (Yousef e Diamandis, 2001; Borgoño *et al.*, 2004) (Figura 4). O membro mais conhecido dessa família é a calicreína 3 – também conhecida como antígeno próstata-específico ou PSA - que é um marcador do câncer de próstata.

Figura 4. Esquema do gene e da proteína das caliceínas segundo Borgoño e Diamandis (2004).

O gene da caliceína 8 (*KLK8*), também conhecido como neuropsina ou ovasina, foi clonado por Yoshida *et al.* (1998) utilizando inicialmente análise de dados de ESTs, seguida por avaliação de expressão em hipocampo e queratinócitos. Mitsui *et al.* (1999) observaram que a caliceína 8 ocorre em duas isoformas (tipo 1 e 2) idênticas exceto pelo fato de que a segunda possui uma inserção de 135 bp no segundo éxon codificante. Essa última é preferencialmente expressa no cérebro humano adulto e no hipocampo, mas ambas estão presentes no cérebro fetal. Na doença de Alzheimer, os níveis de mRNA da *KLK8* no hipocampo mostram elevação de 11,5 vezes (Shimizu-Okabe *et al.*, 2001).

Diferentes tecidos e fluidos biológicos de indivíduos saudáveis também mostram a presença de *KLK8*, como esôfago, pele, testículo, tonsila, rim, mama, glândula salivar, leite, líquido amniótico, plasma seminal e soro (Gan *et al.*, 2000; Kishi T *et al.*, 2003).

Na pele, a *KLK8* está localizada na camada espinhosa superior do estrato córneo. Uma expressão elevada de seu transcrito e proteína foi observada em doenças de pele, como psoríase, *liquen planus* e dermatite atópica, o que sugere seu envolvimento na etiologia de doenças de pele inflamatórias (Kuwae *et al.*, 2002; Komatsu *et al.*, 2005). Os camundongos *knockout* para o gene *KLK8*, embora sem diferença histológica de pele em relação ao selvagem, mostram recuperação lenta da epiderme após inflamação induzida por raios UVB (Kirihaara *et al.*, 2003). Em um modelo animal de psoríase, que causa proliferação da epiderme e hiperqueratose, ocorre um aumento de *KLK8* tanto em animais *knockout* como selvagens, mas esses últimos exibem maior proliferação e descamação de células do epitélio que os primeiros (Kishibe *et al.*, 2007). Portanto, a ausência de *KLK8* pode contribuir para um fenótipo hiperqueratótico.

A caracterização bioquímica da caliceína 8 mostrou que ela é uma protease com especificidade semelhante à tripsina. Rajapakse e colaboradores (2005) verificaram a

capacidade da KLK8 em degradar fibronectina e colágeno tipo IV, componentes da matriz extracelular e da membrana basal, respectivamente. Geralmente a degradação de ambas as proteínas são descritas como uma etapa crítica para as células cancerosas invadirem outros tecidos e formarem metástases. Esses dados sugerem que a KLK8 pode estar envolvida no fenótipo invasivo da célula neoplásica.

Os mesmos autores também observaram que a calicreína 8 foi capaz de converter o ativador de plaminogênio tecidual de cadeia única (tPA) para sua forma protéica de cadeia dupla (Rajapakse *et al.*, 2005). O tPA de cadeia única tem atividade limitada para produção de plasmina, exceto se o cofator fibrina estiver presente, enquanto o tPA de cadeia dupla exibe atividade mesmo na ausência de fibrina (Stubbs *et al.*, 1998). Portanto, a KLK8 pode iniciar, na ausência de fibrina, o sistema tPA/plasmina, que catalisa a degradação de proteínas da membrana basal e da matriz extracelular, facilitando a invasão de tecidos adjacentes pelas células neoplásicas (Andreasen *et al.*, 2000). Nesse mesmo contexto, Ohler *et al.* (2010) demonstraram que a KLK8 é capaz de ativar metaloproteases, como a meprina- β , aparentemente envolvida na diferenciação terminal de queratinócitos (Becker-Pauly *et al.*, 2007). Provavelmente como um mecanismo de controle, a calicreína 8 é inibida em queratinócitos pela proteína serpina B6, um importante regulador da proteólise (Scott *et al.*, 2007).

Em processos neoplásicos, já foram observados níveis reduzidos da KLK8 em carcinoma de mama (Yousef *et al.*, 2004) e níveis elevados em líquido ascítico, soro e células de carcinoma de ovário (Gan *et al.*, 2000; Kishi *et al.*, 2003; Underwood *et al.*, 1999), e em tecido tumoral de pacientes com câncer de cólon (Yousef *et al.*, 2004) e cervical (Cané *et al.*, 2004). Em carcinomas de cabeça e pescoço, os dados são ainda controversos, com diminuição de expressão da calicreína 8 em metástases linfonodais, referida por Liu *et al.* (2008), e aumento de sua expressão bem como de outras KLKs em tecidos tumorais (Pettus *et al.*, 2009).

Os genes de várias calicreínas, entre elas a 8, apresentam elementos de resposta a glicocorticóides e a STAT-5. A presença desses elementos pode explicar a modulação da expressão dessas KLKs pela dexametasona em células de carcinoma cervical e de mama (Shaw e Diamandis, 2008). Considerando o papel antiinflamatório dos glicocorticóides, tanto em câncer como em doenças de pele, os mecanismos envolvidos nessa regulação merecem investigação detalhada.

OBJETIVOS

Considerando os dados da literatura e aqueles obtidos previamente por nosso grupo, o presente projeto investigou o envolvimento de queratinas, mesotelina e calicreína na tumorigênese de cabeça e pescoço. Os objetivos específicos do presente projeto compreenderam:

- a) Estabelecer a cultura primária de queratinócitos bucais humanos normais para avaliação de expressão de genes de interesse e posterior comparação com células neoplásicas de mucosa oral.
- b) Com a utilização do método de RT-PCR quantitativa, analisar o padrão de expressão dos genes *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* em linhagens celulares procedentes de tumores epidermóides de cabeça e pescoço comparando-o com o de células normais correspondentes.
- c) Com a utilização do método de RT-PCR quantitativa, analisar o padrão de expressão dos genes *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* em tumores primários desse sítio anatômico com características agressivas ou menos agressivas e compará-lo com tecidos normais correspondentes.
- d) Investigar o potencial dos genes de interesse como marcadores do fenótipo metastático.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

No presente trabalho, foi analisado um total de 63 casos de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço, que incluíram 29 pares de tumor-margem procedentes de carcinoma de laringe (15 N0 e 14 N+), 10 pares de carcinoma de língua (4 N0 e 6 N+) e 24 de soalho de boca (14 N0 e 10 N+). Na Tabela 1 estão apresentados os dados de cada caso sobre idade, sexo, exposição a fumo e álcool, sítio primário do carcinoma e características anatomopatológicas.

De cada paciente, foram obtidas amostras do tumor e de sua respectiva margem após ressecção cirúrgica no Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, SP, no Hospital Heliópolis, SP, no Hospital das Clínicas, SP e em hospitais de São José dos Campos, SP. O material foi colhido pela equipe do Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço (GENCAPO), um consórcio colaborativo com mais de 50 pesquisadores de nove instituições do Estado de São Paulo, cujo objetivo foi desenvolver análises clínicas, genéticas e epidemiológicas de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Esse material faz parte do banco de amostras do projeto temático FAPESP 04/12054-9 “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço”, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: parecer nº1763/05 – processo 25000). Como novos objetivos foram acrescentados, o presente estudo foi avaliado e recebeu aprovação como aditivo do projeto acima citado.

Imediatamente após a cirurgia, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à macrodissecção por um médico patologista que confirmou, em seções coradas por hematoxilina-eosina de todos os casos, a presença de pelo menos 70% de células tumorais nos carcinomas e ausência dessas células nas margens cirúrgicas.

O conjunto de amostras foi derivado de três sub-sítios anatômicos (língua, soalho de boca e laringe (C02, C04 e C32, respectivamente, segundo o Código Internacional de Doenças / CID-10). Os casos foram classificados em dois sub-grupos principais: aqueles com presença (N+) ou ausência (N0) de metástases em linfonodos regionais, utilizando os dados do sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) da Union Internationale Contre le Câncer – UICC (<http://www.uicc.org/>).

Tabela 1. Lista de amostras de CECP e suas respectivas características.

Caso	Sexo	Idade	Fuma	Etilista	Sítio	TNM	Estádio	Diferenciação Histológica	Infiltração Vascular Sanguínea	Infiltração Linfática	Invasão Perineural	Infiltrado Inflamatório peri-tumoral	Óbito
CP1/0021	M	43	Sim	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Presente	Presente	Ausente	Moderado	Nao
CP1/0024	F	48	Sim	Nunca	Soalho de Boca	T1 N0 M0	I	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Nao
CP1/0032	M	64	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N2C M0	IV	Pouco diferenciado	Ausente	Presente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP1/0055	M	56	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N2B M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP1/0056	F	54	No passado	No passado	Laringe	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Nao
CP1/0057	M	57	Sim	No passado	Língua	T4 N2B M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Outras Causas
CP1/0075	M	54	Sim	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP1/0080	M	67	Sim	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP1/0083	M	72	No passado	No passado	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP1/0089	M	72	No passado	No passado	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Nao
CP1/0151	M	47	Sim	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP1/0191	M	63	Sim	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0200	M	55	Sim	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0213	M	68	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N1 M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Presente	Ausente	Escasso	Nao
CP1/0228	M	40	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N2C M0	IV	Moderadamente	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0233	F	39	Nunca	Nunca	Soalho de Boca	T4 N2C M0		Pouco diferenciado	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Pela Neoplasia
CP1/0240	M	75	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP1/0255	M	50	No passado	Sim	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0258	M	46	Sim	Sim	Soalho de Boca	T1 N2B M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Presente	Ausente	Escasso	Nao
CP1/0262	M	62	No passado	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0348	M	51	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0357	M	76	Nunca	Nunca	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0359	M	55	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0363	M	64	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N2C M0	IV	Moderadamente	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Nao

CP1/0366	M	49	No passado	Sim	Soalho de Boca	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente		Nao
CP1/0370	M	55	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP1/0384	M	46	No passado	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Nao
CP1/0385	M	39	Nunca	Nunca	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP2/0051	M	46	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N2B M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP2/0096	M	46	Sim	Sim	Laringe	T2 N1 M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Nao
CP2/0122	M	56	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N2B M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP2/0168	F	70	No passado	Nunca	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Outras Causas
CP2/1002	M	59	Sim	Sim	Língua	T2 N2C M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	Pela Neoplasia
CP3/0018	M	61	Sim	No passado	Laringe	T4 N2B M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0019	M	54	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP3/0031	M	54	Sim	Sim	Laringe	T4 N2C M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0033	M	51	Sim	No passado	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Nao
CP3/0035	M	54	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Nao
CP3/0049	M	62	No passado	No passado	Língua	T2 N2B M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Nao
CP3/0050	F	44	Sim	No passado	Língua	T2 N1 M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0076	M	64	No passado	No passado	Laringe	T4 N2B M0	IV	Pouco diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Nao
CP3/0085	M	59	Sim	Sim	Laringe	T4 N3 M0	IV	Pouco diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Nao
CP3/0087	M	52	Sim	Sim	Língua	T2 N2C M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Nao
CP3/0096	M	54	Sim	Nunca	Laringe	T4 N0 M0	IV		Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP3/0102	M	49	Sim	Sim	Laringe	T2 N1 M0	III	Bem diferenciado	Presente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP3/0105	M	67	No passado	Sim	Laringe	T4 N2C M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0118	M	45	Sim	Sim	Língua	T4 N3 M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP3/0119	M	67	Sim	Sim	Laringe	T4 N2C M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Presente	Presente		Pela Neoplasia
CP3/0120	F	46	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0125	M	63	No passado	No passado	Laringe	T4 N3 M0	IV	Pouco diferenciado	Presente	Presente	Presente	Moderado	Nao
CP3/0136	M	65	Sim	Sim	Laringe	T4 N2B M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Pela Neoplasia
CP3/0153	M	49	Sim	No passado	Laringe	T3 N3 M0	IV	Moderadamente	Presente	Presente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia

CP3/0199	M	74	Sim	Nunca	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Nao
CP3/0249	M	61	Sim	Sim	Laringe	T2 N0 M-X		Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente		Nao
CP3/0280	M	52	Sim	Sim	Soalho de Boca	T1 N2B M-X		Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente		Nao
CP3/0377	M	78	No passado	No passado	Laringe	T4 N0 M-X		Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente		Outras Causas
CP3/0390	M	55	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M-X		Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	Nao
CP3/0411	M	49	Sim	Sim	Laringe	T4 N2B M-X		Moderadamente	Presente	Ausente	Presente	Intenso	Outras Causas
CP3/0433	M	56	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M-X		Bem Diferenciado	Ausente		Ausente	Escasso	Nao
CP3/0464	M	79	Sim	No passado	Laringe	T4 N2B M-X		Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	Pela Neoplasia
CP4/0001	M	52	No passado	No passado	Laringe	T3 N2C M-X		Moderadamente	Ausente	Presente	Ausente	Moderado	Nao
CP4/0016	F	52	Sim	Sim	Laringe	T1 N0 M-X		Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Nao
CP4/0024	M	45	Sim	No passado	Laringe	T4 N0 M-X		Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	

No presente estudo, foram também estudadas as linhagens celulares Hep-2 (uma linhagem originalmente descrita como sendo de laringe), FaDu (procedente de carcinoma de orofaringe), UM-SCC-38 (carcinoma de tonsila pilar) e SCC9 (carcinoma de língua). As duas primeiras linhagens foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Otávia Luisa Silva Damas de Caballero, Instituto Ludwig, NY. A linhagem UM-SCC-38 foi cedida pelo Prof. Dr. Thomas Carey da Universidade de Michigan e a linhagem SCC9 foi cedida pelo Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Tabela 2).

Como controle, foram estudados queratinócitos bucais humanos normais, cedidos pela Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, ou procedentes de cultura primária desenvolvida em nosso laboratório a partir de amostras de gengiva, obtidas em cirurgias estéticas ou para retirada de terceiro molar e realizadas pelo Dr. Breno Gutierrez Motta. Além dos queratinócitos, foram utilizados fibroblastos murinos (ATCC Nº catálogo CCL-92 3T3-Swiss albino), gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor,

Tabela 2. Características das linhagens utilizadas no estudo segundo a American Type Culture Collection (ATCC).

Linhagem	Características	Dados dos pacientes	
		Idade	Sexo
Hep-2	Linhagem celular epidermóide originalmente descrita como sendo de carcinoma de laringe, com contaminação pela linhagem HeLa (ATCC: CCL23)	Não consta	Não consta
FaDu	Carcinoma epidermóide de células escamosas de faringe (ATCC: HTB-43)	56	Masculino
SCC-9	Carcinoma epidermóide de células escamosas de língua (ATCC: CRL-1629)	25	Masculino
UM-SCC-38	Carcinoma epidermóide de tonsila T2N2aM0, estágio IV, moderadamente diferenciado, sem terapia prévia	60	Masculino

Metodologia

Cultura de Linhagens Celulares

O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) foi utilizado para crescimento e manutenção da linhagem celular UM-SCC-38 e o meio MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) foi utilizado para as linhagens Hep-2 e FaDu. Ambos

foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), aminoácidos não essenciais 10mM (Gibco), penicilina 100U/mL (Gibco), estreptomicina 100µg/mL (Gibco) e anfotericina B 2,5µg/mL (Gibco). Foi também adicionado piruvato de sódio 1mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aos meios das linhagens Hep-2 e FaDu, e L-glutamina 2mM (Gibco) ao meio da UM-SCC-38. A linhagem SCC9 foi cultivada em meio DMEM suplementado com nutriente F-12 (Gibco) na proporção de 1:1, além de 10% de soro fetal bovino, hidro cortisona 0,4 µg/mL (Sigma-Aldrich), penicilina 100U/mL (Gibco), estreptomicina 100µg/mL (Gibco) e anfotericina B 2,5µg/mL (Gibco). As linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em frascos plásticos de 25 ou 75 cm².

Durante a fase de manutenção das linhagens, os meios de cultura foram substituídos a cada três ou quatro dias e, quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, as células foram tripsinizadas e subdivididas em duas réplicas. Para isto, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e incubadas a 37°C com 1 mL ou 2 mL de solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Gibco), para frascos de 25 cm² ou 75 cm², respectivamente. Dependendo da linhagem, as células destacaram-se do soalho do frasco de cultura após um período de 2 e 5 min, o que foi constatado por observação em microscópio invertido. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino.

Para manutenção do estoque de linhagens, as células foram tripsinizadas (conforme descrito acima), centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min e ressuspensas em solução de dimetilsulfóxido 10% (DMSO, Sigma-Aldrich) e 90% de soro fetal bovino, sendo em seguida congeladas em nitrogênio líquido.

Para os experimentos do presente estudo, as células foram semeadas com uma densidade de 1 x 10⁶ células/mL/frasco de 75cm² e mantidas em meio completo com 10% de soro por 24 horas para que ocorresse sua adesão ao frasco. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por outro sem soro, para que as células entrassem em estado de quiescência e parassem de proliferar. Após mais 24 horas, o meio foi substituído pelo meio completo com 10% de soro. A partir desse ponto, foram contadas 24, 48 e 72 horas para coleta das células.

Cultura Primária de Queratinócitos

Fragmentos de gengiva de pacientes submetidos a cirurgias estéticas ou para retirada de terceiro molar foram mantidos por até 12 horas antes de seu processamento em meio de transporte DMEM, sem soro, com penicilina (200 U/mL), streptomicina (200 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL) e anfotericina B (5 µg/mL). Em cabine de fluxo laminar, os fragmentos foram lavados em solução balanceada de Hanks (HBSS), por alguns segundos,

para retirada de resíduos de sangue. Após essa etapa, o material foi mergulhado em álcool etílico 70% por 15 s, e novamente tratados com HBSS. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo que a última solução foi suplementada com penicilina (100 U/mL), streptomomicina (100 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL) e anfotericina B (2.5 µg/mL).

Em seguida, foi feita a separação do epitélio com pinça e lâmina de bisturi, sobre uma placa de Petri. O epitélio foi, então, subdividido em fragmentos menores, que foram imersos em solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% e mantidos sobre agitação branda a 37°C. A cada 30 min, o sobrenadante foi recolhido e a ação da tripsina foi neutralizada com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), streptomomicina (100 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL) e anfotericina B (2.5 µg/mL). Ao fragmento original, foi novamente acrescentada a solução de tripsina/EDTA e o procedimento foi repetido 8 vezes. Os sobrenadantes foram reunidos e centrifugados a 1500 rpm por 5 min, e o sedimento com as células foi ressuspensionado em meio de cultura próprio para queratinócitos, descrito a seguir.

O total de queratinócitos obtidos foi semeado sobre uma camada de sustentação (*feeder-layer*) de fibroblastos murinos irradiados. O conjunto queratinócitos/*feeder-layer* foi nutrido com meio de cultura constituído de DMEM e Ham F12 (proporção 2:1), 10% de soro fetal bovino, penicilina 100U/mL, estreptomomicina 100µg/mL, anfotericina B 2,5µg/mL, L-glutamina 4mM, adenina 0,18mM (Sigma-Aldrich), insulina 5µg/mL (Sigma-Aldrich), hidrocortisona 0,4µg/mL (Sigma-Aldrich), toxina colérica 0,1nM (Sigma-Aldrich) e triiodotironina 20pM (Sigma-Aldrich). A partir da primeira troca de meio, foi adicionado o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF, Sigma-Aldrich), na concentração de 10ng/mL. As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem a sub-confluência.

Curvas de Proliferação Celular para Padronização da Camada de Sustentação

Para verificar o potencial proliferativo dos fibroblastos murinos irradiados, foram comparadas suas curvas de proliferação com as de fibroblastos de mesma origem, porém não irradiados.

Um total de 2×10^5 células irradiadas e não-irradiadas foi semeado em frascos de cultura de 25 cm² com 3mL de meio DMEM, 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (2mM), aminoácidos não essenciais (10mM), penicilina 100U/mL, estreptomomicina 100µg/mL e anfotericina B 2,5µg/mL. Após 24 horas, o meio foi trocado por DMEM livre de soro e as células foram incubadas por mais 24 horas. Para estimular o crescimento celular, o meio foi substituído por DMEM com 10% de soro. Após 24, 72, 120 e 168 horas, as células de 3 frascos de fibroblastos murinos irradiados com 60 Gy, 80 Gy de raio X e não-irradiados foram lavadas com PBS a 37 °C e incubadas com 1 mL de solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02%, também a 37°C. Quando completamente separadas do soalho do frasco, foi coletada

uma amostra para contagem do número de células. A tripsina foi inativada com 1 mL de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido.

Extração de RNA

Para extração de RNA das amostras de tumores primários, foi utilizado o protocolo de extração sequencial padronizado no laboratório, que permite a separação de DNA e proteína, além de RNA.

As amostras foram adequadamente pulverizadas em cadinhos com nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 3 mL de Trizol (Gibco), que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. O material foi, então, distribuído em três tubos de 1,5mL e mantido à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 200µL de clorofórmio gelado para cada mL de amostra em Trizol, os tubos foram homogeneizados por 30 s e incubados por 3 min à temperatura ambiente sendo, em seguida, acondicionados em gelo. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 20 min a 4°C, para separação da fase aquosa que contém RNA, da interfase branca e leitosa que contém principalmente DNA, e da fase orgânica, com proteína. A fase aquosa com RNA foi transferida para um novo tubo com 400µL de isopropanol gelado e 10µg de glicogênio e mantida por 15 min à temperatura ambiente. Após essa etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1mL de etanol 75% gelado, agitado até se soltar do tubo e centrifugado a 7.500g por 5 min a 4°C. O tubo foi, então, seco sobre papel absorvente à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensionado em 20-50µL de água livre de nucleases (dependendo do tamanho do sedimento). As amostras foram colocadas em banho seco a 500g por 10 min a 57°C. Uma alíquota de RNA foi checada em gel de agarose 1,5% para avaliar sua qualidade e quantificado posteriormente. O RNA restante foi armazenado a -80°C até seu uso. A síntese de cDNA foi realizada com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para promover a transcrição reversa.

A fase orgânica obtida da extração do RNA foi utilizada para separação de DNA e proteínas segundo protocolos padronizados no laboratório. O material foi armazenado para uma possível utilização posterior.

Para as linhagens celulares, a extração de RNA seguiu protocolo padrão, com utilização de Trizol, e não o método sequencial.

Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa (RT-PCR)

As amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Segundo o resultado da quantificação, as

amostras foram diluídas para uma concentração final de 1ug/μL. O material foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase 1U/ul (Promega, Madison, WI, USA) para eliminação de DNA genômico, e submetido à reação de transcrição reversa com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), que permite a inicialização da síntese da molécula de cDNA por *random priming*, oligo (dT) ou iniciadores específicos, utilizando a transcriptase reversa MultiScribe. As concentrações de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa estão apresentadas na Tabela 3. As condições da reação de PCR foram: 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; 85°C por 5 min; 4°C ∞.

Tabela 3. Concentrações de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa. Água DEPC foi adicionada até atingir o volume final de 50 μl.

Reagentes	Concentrações/reação de RT
<i>RNA</i>	1ug/μL
<i>Random Primer</i>	10X – 5μL
<i>dNTPs</i>	100 mM – 2μL
<i>RT Buffer</i>	10X – 5μL
<i>MultiScribe</i>	50U/ul – 2,5μL
Água DEPC	Até 50 μL

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

A PCR em tempo real foi a técnica utilizada para análise da expressão dos genes de interesse (*KRT6A*, *KRT19*, *KLK8* e *MSLN*) em linhagens celulares, em tumores primários e suas margens cirúrgicas e em queratinócitos bucais humanos normais, obtidos após cultura primária.

As etapas da PCR foram realizadas no equipamento *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems) com utilização do sistema de amplificação TaqMan e do reagente Taqman Universal PCR Master Mix, que contém todos os reagentes necessários para a reação. Esse sistema utiliza sondas marcadas com fluorescência de comprimentos de onda diferentes, o que permite a amplificação de dois genes (alvo e padrão interno) na mesma reação. Todas as sondas utilizadas para o desenvolvimento do projeto foram desenhadas pela própria empresa (Applied Biosystems) e marcadas com o fluoróforo FAM na extremidade 5'. Na extremidade 3', está ligada a molécula chamada “*quencher*”, que produz a transferência de energia ressonante fluorescente, reduzindo assim a fluorescência do repórter quando a sonda está intacta. Durante a reação de PCR ocorre a

hibridação dos iniciadores e da sonda e, durante a extensão dos iniciadores, a enzima Taq polimerase, por meio de sua atividade 5'-3' exonucleásica, cliva a sonda na sua extremidade 5' (Figura 5).

A fluorescência emitida pelo repórter é detectada continuamente para cada amostra, entre 520 e 670 nm, sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados são traduzidos por um *software* específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência versus o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos necessários para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa. Esse ponto é definido como limiar ou C_t e ocorre durante a fase exponencial de amplificação. Assim, cada amostra apresenta um valor de C_t específico.

Os valores C_t obtidos para os genes alvo nas linhagens celulares foram normalizados por um fator de normalização calculado para cada amostra pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) com base na média geométrica dos dados obtidos para os padrões internos *GAPDH*, *ACTB*, *HPRT1* e *BCR*. O cDNA de queratinócitos bucais foi utilizado como controle para todas as linhagens.

Figura 5. Esquema das etapas da PCR quantitativa. Adaptado de Koch (2004). R = repórter, Q = quencher, Taq = Taq polimerase.

Para as amostras de tumores primários, o programa geNorm calculou a estabilidade dos padrões internos *GAPDH*, *ACTB*, *HPRT1* e *BCR*, comparando os valores de sua expressão em amostras de margens cirúrgicas com os valores dos respectivos tumores. Para essa análise, as amostras de margens cirúrgicas foram combinadas em quatro pools específicos para os sítios anatômicos laringe e cavidade oral (língua e soalho de boca) e para os grupos N+ e N0. As amostras de tumores não foram combinadas em pools.

Não foi possível a obtenção de um fator de normalização para os tumores primários porque o programa geNorm, para cálculo da média geométrica, necessita de várias amostras para cada controle. Entretanto o estudo faz a comparação de um único tecido investigado com o tecido controle do mesmo paciente, ou seja, a margem cirúrgica.

As reações de PCR foram feitas em triplicata com um volume final de 10µl, sendo 5µl de Taqman Universal PCR Master Mix, 0,5µl da sonda, 1µl de cDNA e 3,5µl de água. As condições da ciclagem foram: 50°C – 2 min; 95°C – 10 min; 40 ciclos de: 95°C – 15 s e 60°C – 1 min.

Determinação da Eficiência dos Iniciadores

A eficiência de amplificação dos iniciadores foi avaliada pela construção de uma curva-padrão para cada gene investigado. Para os genes *KRT19*, *MSLN*, *GAPDH*, *ACTB*, *HPRT1* e *BCR*, foram realizadas diluições em série de quantidades conhecidas de cDNA (20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng, 1,25ng, 0,625 ng) da linhagem celular Hep-2 e, para os genes *KRT6A* e *KLK8*, as diluições foram feitas a partir da linhagem celular FaDu. A partir da curva-padrão, foi calculada a equação da reta, permitindo a obtenção do valor de *slope*. O *slope* corresponde à inclinação da reta quando é analisada a variação do Ct dos transcritos alvo e do padrão interno em função do log de diferentes quantidades de cDNA. O cálculo da eficiência foi realizado segundo a fórmula: $E=10^{(-1/slope)}$.

Cálculo da Expressão Relativa dos Genes *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8*

No caso de linhagens celulares, a taxa relativa de expressão dos genes de interesse foi calculada com a fórmula abaixo, segundo o programa geNorm, na qual E=eficiência e ΔCt é a diferença entre o Ct da amostra controle e da amostra tumoral.

$$\text{Taxa relativa de expressão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct(\text{amostra controle} - \text{amostra tumoral})}}{\text{Fator de Normalização}}$$

Para as amostras de tumores primários, os valores de expressão dos genes de interesse foram calculados com a fórmula abaixo (Pfaffl, 2001), utilizando os valores do padrão interno selecionado pelo programa geNorm.

$$\text{Taxa relativa de expressão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct}(\text{amostra controle} - \text{amostra tumoral})}}{(E_{\text{padrão interno}})^{\Delta\text{Ct}(\text{amostra controle} - \text{amostra tumoral})}}$$

Foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 3.0 ou ≤ -3.0 em relação ao tecido controle, após a transformação dos valores para logaritmo de base 3. Dessa forma, um valor de expressão relativa igual a +1 equivale a um aumento de expressão de 3 vezes, e um valor de -1 equivale a uma diminuição de expressão de 3 vezes.

Análise Estatística

A análise dos componentes principais (Bergkvist *et al.*, 2010) foi utilizada para verificar possíveis associações entre as variáveis sexo, idade, consumo de tabaco, consumo de álcool, TNM, estágio, diferenciação histológica, infiltração vascular sanguínea, infiltração linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório peri-tumoral e óbito, com o aumento/diminuição de expressão dos genes estudados, de acordo com o sítio anatômico. Por definição matemática, os componentes principais são extraídos em sucessiva ordem de importância, procurando explicar a informação (variação) nos dados. Essa técnica é muito eficiente em separar efeitos sistemáticos de ruídos.

Também foi utilizado o test t de Student não-pareado para verificar a significância dos dados de expressão dos genes entre as amostras N0 e N+ de cada sítio. Essa expressão foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$, na qual $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$, para cada amostra. Essa abordagem constitui uma alternativa para verificar a variação de expressão de cada gene entre as amostras tumorais, sem a comparação com as respectivas margens.

RESULTADOS

Casuística

Foram analisadas 63 pares de amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, que incluíram 29 pares de tumor-margem procedentes de carcinoma de laringe (15 N0 e 14 N+), 10 pares de carcinoma de língua (4 N0 e 6 N+) e 24 de soalho de boca (14 N0 e 10 N+); 56 pacientes eram do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com idades variando de 39 a 79 anos (média = 56,5 anos); 60 referiram exposição ao tabaco, sendo 14 ex-fumantes; 56 pacientes faziam uso de álcool, mas 15 haviam abandonado o hábito etílico; 56 relataram exposição ao fumo e ao álcool e apenas 3 pacientes nunca fumaram e não eram etilistas. A classe TNM mais freqüente foi a T4N0M0 (Tabela 4).

Curvas de Proliferação Celular para Padronização da Camada de Sustentação

Após irradiação de fibroblastos murinos (3T3-Swiss albino) com doses de 60 e 80 Gy de raio X, foram construídas curvas de proliferação celular para avaliação da eficiência das doses sobre a inibição de proliferação. Foi observada uma freqüência elevada (62,5% para a dose de 60Gy e 61,25 para a dose de 80Gy) de morte das células irradiadas no tempo de 24 horas e, só após esse período, os fibroblastos entraram em processo de duplicação. Para ambas as doses de radiação, ocorreu um pico de replicação celular entre 24 e 72 horas, mas o crescimento dos fibroblastos irradiados com 60Gy foi significativamente maior. Entre 72 e 120 horas, o número de células irradiadas com 60Gy teve um pequeno aumento, ao contrário daquelas irradiadas com 80Gy. Entre 120 e 168 horas, houve morte celular em ambas as condições (Figuras 6). Em função desses resultados, os fibroblastos irradiados com 60Gy foram escolhidos para a camada de sustentação em culturas de queratinócitos.

Padronização da Cultura Primária de Queratinócitos

Após desagregação enzimática da camada de queratinócitos bucais humanos normais, as células foram cultivadas sobre a camada de sustentação de fibroblastos. As colônias de queratinócitos foram visualizadas após dez dias de cultivo. À medida que as colônias cresciam, ocorria a morte dos elementos da camada de sustentação (Figura 7).

Tabela 4. Frequência dos parâmetros sexo, idade, exposição a fumo e álcool, sítio primário e classificação das lesões em 63 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço segundo tamanho (T), comprometimento de linfonodos (N1-3) ou não (N0), e ausência de metástases (M0) ou não (M1-X).

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes (%)
Sexo	Masculino	56 (88,9%)
	Feminino	7 (11,1%)
Idade*	≥ 40	61 (96,8%)
	< 40	2 (3,2%)
Fumante	Sim	46 (73,0%)
	No passado	14 (22,2%)
	Não	3 (4,8%)
Etilista	Sim	41 (65,1%)
	No Passado	15 (23,8%)
	Não	7 (11,1%)
Sítio Primário	Língua (C02)	10 (15,9%)
	Soalho de boca (C04)	24 (38,1%)
	Laringe (C32)	29 (46,0%)
Classificação	T1	4 (6,4%)
	T2	16 (25,4%)
	T3	12 (19,0%)
	T4	31 (49,2%)
	N0	33 (52,4%)
	N1	4 (6,35%)
	N2	22 (34,9%)
	N3	4 (6,35%)
	M0	53 (84,1%)
	M1-X	10 (15,9%)

* Idade média do grupo = 56,5 anos

A

B

Figura 6. Curvas de crescimento de fibroblastos murinos (3T3-Swiss albino) (A) após irradiação com doses de 60 e 80- Gy e (B) sem irradiação.

Figura 7. Aspecto morfológico de queratinócitos primários de cavidade oral cultivados sobre camada de sustentação de fibroblastos murinos irradiados. Culturas subconfluentes, observadas em aumento de 100x. **Seta.** Feeder-layer remanescente. **Asterisco (*).** Colônia de queratinócitos.

Curvas-Padrão

As curvas-padrão para os genes de interesse *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* e para os padrões internos *BCR*, β -actina, *GAPDH* e *HPRT1* (Figura 8) foram realizadas utilizando diluições de cDNA das linhagens celulares Hep-2 e FaDu. Os valores de *slope* (coeficiente angular da reta) e da eficiência dos iniciadores, segundo a fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})}$, estão apresentados na Tabela 5.

Foi verificada uma baixa variação dos valores de eficiência das sondas utilizadas (a diferença entre o maior valor de eficiência observado e o menor foi de apenas 0,04). Todos os valores foram próximos de 100% (o valor 2 equivale a uma eficiência de 100%), o que indica uma excelente qualidade das sondas.

Figura 8. Gráficos ilustrando as curvas-padrão dos genes alvo *KRT6A* (A), *KRT19* (B), *MSLN* (C), *KLK8* (D) e dos padrões internos *GAPDH* (E), β -actina (F), *HPRT1* (G), *BCR* (H).

Tabela 5. Valores do coeficiente angular da reta (*slope*) e da eficiência ($10^{-1/\text{slope}}$) dos iniciadores para os genes de interesse (*KRT6A*, *KRT19*, *MSLN*, *KLK8*) e para os padrões internos (*GAPDH*, β -actina, *HPRT1*, *BCR*).

Gene	<i>Slope</i>	-1/ <i>slope</i>	$10^{-1/\text{slope}}$
<i>KRT6A</i>	-3,273659	0,305	2,02
<i>KRT19</i>	-3,327752	0,300	1,99
<i>MSLN</i>	-3,242906	0,308	2,03
<i>KLK8</i>	-3,321895	0,301	2,00
<i>GAPDH</i>	-3,328197	0,300	1,99
β -actina	-3,326278	0,300	1,99
<i>HPRT1</i>	-3,310846	0,302	2,00
<i>BCR</i>	-3,308262	0,302	2,00

Linhagens Celulares

Foi analisada a expressão dos genes de interesse *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* e dos genes constitutivos β -actina, *BCR*, *GAPDH* e *HPRT1* nas quatro linhagens celulares (FaDu, Hep-2, SCC9, UM-SCC-38) e nos queratinócitos bucais humanos normais para cálculo do fator de normalização. O programa geNorm concluiu que o gene *BCR* não é um bom normalizador por não apresentar estabilidade adequada. Por esse motivo, esse gene foi excluído das análises (Tabela 6).

Após a obtenção do fator de normalização, foi calculada a expressão relativa dos genes de interesse pela fórmula referida em Materiais e Métodos, utilizando os queratinócitos normais como controle. A Tabela 7 mostra os valores obtidos. Esses valores, em logaritmo de base 3 para os genes de interesse *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8*, estão apresentados na Tabela 8 e na Figura 9.

Como pode ser observado, os genes *KRT6A* e *KLK8* não são expressos nas células Hep-2 e exibem baixos níveis nas demais linhagens, independentemente da duração do cultivo. Um padrão paralelo, mas não idêntico, ocorreu com os transcritos de *KRT19*, que mostrou redução em todas as linhagens e em todos os tempos de cultivo, exceto em UM-SCC-38. No caso de *MSLN*, o perfil foi variável, com níveis reduzidos em UM-SCC-38 e nas culturas de 24 horas de SCC9. Por outro lado, exibiu elevação de expressão em FaDu e Hep-2 com a progressão do cultivo. Em resumo, todos os genes apresentaram ausência ou diminuição de expressão nas linhagens estudadas em comparação com queratinócitos bucais humanos normais, com exceção da mesotelina, que apresentou um padrão irregular de expressão.

Tabela 6. Resultados obtidos no cálculo do fator de normalização pelo programa geNorm para os transcritos dos genes *GAPDH*, β -actina e *HPRT1* nas linhagens celulares FaDu, Hep-2, SCC9, UM-SCC-38 cultivadas por 24, 48 e 72 horas em relação aos queratinócitos bucais humanos normais (BHK).

	GAPDH	B-actina	HPRT1	Normalisation Factor	
BHK	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,8857	
Hep2 24h	8,96E-01	7,65E-01	1,10E+00	1,7182	
Hep2 48h	3,89E-01	1,54E-01	5,09E-01	0,5888	
Hep2 72h	5,29E-02	2,66E-02	2,52E-02	0,0619	
Fadu 24h	8,36E-01	1,13E+00	1,59E+00	2,1630	
Fadu 48h	3,80E-01	2,89E-01	4,05E-01	0,6686	
Fadu 72h	6,35E-01	5,03E-01	1,07E+00	1,3172	
SCC9 24h	4,54E-01	1,14E+00	2,50E+00	2,0553	
SCC9 48h	4,48E-01	5,97E-01	1,44E+00	1,3721	
SCC 72h	4,33E-01	5,29E-01	1,30E+00	1,2606	
UM-SCC-38 24h	5,92E-01	3,83E-01	7,30E-01	1,0345	
UM-SCC-38 48h	1,11E+00	4,20E-01	4,90E-01	1,1541	
UM-SCC-38 72h	5,69E-01	3,56E-01	8,45E-01	1,0466	
M < 1,5	0,896	0,666	0,789		

Tabela 7. Valores de expressão relativa dos genes alvo *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* nas linhagens celulares FaDu, Hep-2, SCC9, UM-SCC-38 cultivadas por 24, 48 e 72 horas, utilizando queratinócitos bucais normais como controle.

	<i>KRT6A</i>	<i>KRT19</i>	<i>MSLN</i>	<i>KLK8</i>
Hep2 24h	Não expressa	7,01E-05	2,588989	Não expressa
Hep2 48h	Não expressa	0,000239	14,29363	Não expressa
Hep2 72h	Não expressa	0,001235	84,8128	Não expressa
Fadu 24h	0,000145	0,020972	3,441774	7,67E-05
Fadu 48h	0,000132	0,057479	8,977142	0,000118
Fadu 72h	2,29E-05	0,02266	13,3684	0,000104
SCC9 24h	0,003448	0,001129	0,26138	0,000332
SCC9 48h	0,006767	0,002084	0,778368	0,001262
SCC9 72h	0,008039	0,002768	0,653351	0,002199
UM-SCC-38 24h	0,222055	0,928205	0,032675	0,043016
UM-SCC-38 48h	0,039633	0,670183	0,021973	0,139562
UM-SCC-38 72h	0,023897	0,434244	0,041229	0,111811

Tabela 8. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 dos genes alvo *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* nas linhagens celulares FaDu, Hep-2, SCC9, UM-SCC-38 cultivadas por 24, 48 e 72 horas.

	<i>KRT6A</i>	<i>KRT19</i>	<i>MSLN</i>	<i>KLK8</i>
Hep2 24h	Não expressa	-8,70753	0,865881	Não expressa
Hep2 48h	Não expressa	-7,58871	2,421067	Não expressa
Hep2 72h	Não expressa	-6,09524	4,041869	Não expressa
Fadu 24h	-8,04429	-3,5177	1,125044	-8,62451
Fadu 48h	-8,12933	-2,59994	1,997685	-8,23208
Fadu 72h	-9,72398	-3,44724	2,360154	-8,35118
SCC9 24h	-5,16109	-6,17751	-1,22134	-7,29095
SCC9 48h	-4,54725	-5,61922	-0,22807	-6,07578
SCC9 72h	-4,39045	-5,36096	-0,38744	-5,57062
UM-SCC-38 24h	-1,36976	-0,06782	-3,11407	-2,86378
UM-SCC-38 48h	-2,93833	-0,36428	-3,47523	-1,79249
UM-SCC-38 72h	-3,39883	-0,75927	-2,9024	-1,99429

Figura 9. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 dos genes alvo *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8* nas linhagens celulares (A) FaDu, (B) Hep-2, (C) SCC9 e (D) UM-SCC-38 cultivadas por 24, 48 e 72 horas.

Seleção do Padrão Interno para Tumores Primários

O programa geNorm selecionou, entre os padrões internos *GAPDH*, *ACTB*, *HPRT1* e *BCR*, dois genes com estabilidade adequada para normalização dos valores de expressão de genes alvo em tumores primários. Como esses dois genes eram diferentes para cada sítio anatômico, exceto o *GAPDH*, esse gene foi utilizado no cálculo da expressão relativa para o grupo todo (Tabela 9).

Os valores médios de Cts dos padrões internos obtidos de pools de amostras de margens cirúrgicas e de amostras individuais de carcinomas primários e suas margens estão apresentados na Tabela 1 do Anexo 1.

Tabela 9. Genes selecionados pelo programa geNorm como mais estáveis para utilização na normalização da expressão gênica.

Sítio anatômico	Genes Selecionados
Língua/Soalho de boca N0	<i>GAPDH</i> e β -actina
Língua/Soalho de boca N+	<i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i>
Laringe N0	<i>GAPDH</i> e β -actina
Laringe N+	<i>GAPDH</i> e β -actina

Expressão do gene *KRT6A*

Os valores médios de Ct e de expressão relativa do gene *KRT6A*, bem como o $\log_3$ da expressão relativa, estão apresentados na Tabela 2 do Anexo 1.

Os resultados observados em carcinomas de língua, soalho de boca e laringe mostraram que, em média, não houve alteração de expressão do gene *KRT6A* em relação às margens cirúrgicas, embora algumas amostras tenham exibido um aumento ou uma diminuição significativa de níveis de transcritos (Figura 10). De acordo com a presença/ausência de metástases linfonodais, não foi verificada diferença entre os grupos N+ e N0 nos carcinomas epidermóides de língua, com 1 amostra N0 e 1 N+ exibindo aumento de expressão, e 1 N0 e 2 N+ com diminuição de expressão (Figura 10 e Tabela 2 do Anexo 1).

Nas amostras de soalho de boca, 8 amostras revelaram aumento de expressão, sendo 4 N+ e 4 N0, e 4 diminuição dos níveis dos transcritos, 1 N0 e 3 N+ (Figura 10 e Tabela 2 do Anexo 1).

Nos carcinomas de laringe, os resultados também foram heterogêneos: 6 amostras N0 e 5 N+ com aumento, e 4 N0 e 2 N+ com diminuição de expressão (Figura 10 e Tabela 2 do Anexo 1).

A análise dos componentes principais não revelou associação entre os parâmetros analisados e a expressão diferencial da queratina 6A. O teste t de Student não identificou diferença significativa entre os valores de expressão dos tumores N0 e N+ em cada sítio anatômico.

Figura 10. Valores de expressão relativa apresentados em $\log_3$, referentes à análise do gene *KRT6A* em amostras (A) de língua, soalho de boca e laringe e (B) N0 e N+ de cada sítio anatômico.

Expressão do gene *KRT19*

Os valores médios de Ct e de expressão relativa do gene *KRT19*, bem como o $\log_3$ da expressão relativa, estão apresentados na Tabela 3 do Anexo 1.

Para esse gene, das 63 amostras analisadas, 30 apresentaram redução e 13 aumento de níveis de transcritos (Figura 11). Considerando os casos de carcinoma de língua, 1 amostra mostrou aumento de expressão, sendo que o paciente não possuía metastases linfonodais, e 3 diminuição de expressão, das quais 1 amostra é N0 e 2 são N+ (Figura 11 e Tabela 3 do Anexo 1).

Foi verificado, em de soalho de boca, 7 amostras com elevação dos níveis dos transcritos (6 amostras N0 e 1 amostra N+) e 10 amostras com diminuição de expressão (5 amostras N0 e 5 N+) (Figura 11 e Tabela 3 do Anexo 1).

Os carcinomas de laringe mostraram um padrão mais homogêneo, com tendência à redução de níveis de transcritos: 2 amostras N0 e 2 N+ com aumento, e 9 N0 e 8N+ com diminuição de expressão (Figura 11 e Tabela 3 do Anexo 1). Sem levar em conta a presença de metástase, das 29 amostras de laringe analisadas, 17 tiveram redução e apenas 4 tiveram aumento de expressão (Figura 11).

Em resumo, as amostras de língua N+, laringe N0 e N+ mostraram diminuição significativa de expressão do *KRT19*.

A análise dos componentes principais não revelou associação entre os parâmetros analisado e a expressão diferencial da queratina 19. O teste t de Student não identificou diferença significativa entre os valores de expressão dos tumores N0 e N+, exceto para soalho de boca, que mostraram-se estatisticamente diferentes ($p=0,03$).

Figura 13. Valores de expressão relativa apresentados em $\log_3$, referentes à análise do gene *KRT19* em amostras (A) de língua, soalho de boca e laringe e (B) N0 e N+ de cada sítio anatômico.

Expressão do gene *MSLN*

Os valores médios de Ct e de expressão relativa do gene *MSLN*, bem como o $\log_3$ da expressão relativa, estão apresentados na Tabela 4 do Anexo 1.

Da mesma forma que para o gene *KRT19*, os resultados obtidos mostraram uma tendência para a redução de expressão de *MSLN*: 17 casos com expressão elevada e 26 com expressão reduzida, além de duas amostras de tumores (CP1/0056 T e CP3/0199 T) e três de margens (CP1/0255 M, CP1/0370 M e CP3/0019 M) sem presença aparente de transcritos (Figura 12). Essa tendência foi principalmente decorrente dos achados em carcinomas de laringe, que mostraram aumento de expressão em 2 amostras e redução em 5 no grupo N0 e 2 casos com aumento e 7 com redução significativa de expressão no grupo N+ (Figura 12 e Tabela 4 do Anexo 1).

Nos carcinomas de língua, 2 amostras revelaram aumento de transcrição do gene *MSLN*, sendo elas de pacientes sem metástases para linfonodos. Foram observadas 3 amostras com diminuição de expressão, sendo 1 N0 e 2 N+ (Figura 12 e Tabela 4 do Anexo 1).

As amostras de assoalho de boca, ao contrário do que foi encontrado em laringe, exibiram perfil homogêneo, com níveis elevados em 6 amostras N0 e 4 N+, e níveis reduzidos em 5 amostras N0 e 4 N+ (Figura 12 e Tabela 4 do Anexo 1). Sem levar em conta a agressividade do tumor, 10 amostras apresentaram aumento de expressão e 9 com redução dos níveis de mRNA da mesotelina (Figura 12).

Observando a análise dos componentes principais, não houve associação entre os parâmetros analisado e a expressão diferencial da mesotelina. O teste t de Student não identificou diferença significativa entre os valores de expressão dos tumores N0 e N+ de cada sítio anatômico.

Figura 12. Valores de expressão relativa apresentados em $\log_3$, referentes à análise do gene *MSLN* em amostras (A) de língua, soalho de boca e laringe e (B) N0 e N+ de cada sítio anatômico.

Expressão do gene *KLK8*

Os valores médios de Ct e de expressão relativa do gene *KLK8*, bem como o $\log_3$ da expressão relativa, estão apresentados na Tabela 5 do Anexo 1.

Em média, as amostras analisadas não exibiram alteração de expressão do gene *KLK8* (Figura 13). Individualmente, 16 possuíam aumento e 14 diminuição de expressão; em uma amostra de margem cirúrgica (CP3/0096 M), não foram detectados transcritos de *KLK8*. As amostras de língua, entretanto, mostraram tendência à redução de níveis dos transcritos: 5 amostras tiveram redução (1 N0 e 4 N+) e apenas 1 (N0) teve aumento de expressão (Figura 13 e Tabela 5 do Anexo 1).

Entre os carcinomas de soalho de boca, 9 apresentaram elevação de transcrição do gene *KLK8*, sendo 5 amostras N0 e 4 N+, enquanto 3 amostras exibiram diminuição de expressão, todas N+ (Figura 13 e Tabela 5 do Anexo 1). Nesse grupo verifica-se uma tendência de elevação da expressão da calicreína 8.

Nas amostras de laringe, 3 amostras N0 e 3 N+ exibiram aumento de expressão, e 4 N0 e 2 N+ exibiram redução de expressão (Figura 13 e Tabela 5 do Anexo 1).

Observando a análise dos componentes principais, não houve associação entre os parâmetros analisado e a expressão diferencial da calicreína 8. O teste t de Student não identificou diferença significativa entre os valores de expressão dos tumores N0 e N+ de cada sítio anatômico.

Figura 13. Valores de expressão relativa apresentados em $\log_3$, referentes à análise do gene *KLK8* em amostras (A) de língua, soalho de boca e laringe e (B) N0 e N+ de cada sítio anatómico.

DISCUSSÃO

O presente trabalho foi proposto com o objetivo de investigar o envolvimento de queratinas, mesotelina e calicreína na tumorigênese de cabeça e pescoço, com foco na busca de diferenças de expressão desses genes entre tumores metastáticos e não metastáticos. As amostras estudadas compreenderam linhagens celulares e amostras de queratinócitos bucais e de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço.

Verificando os dados das amostras de carcinomas, é observado que 88,9% dos pacientes são do sexo masculino. Esse achado é comum nesse grupo de doenças e tem sido confirmado por muitos estudos (Argiris *et al.*, 2008) e nas estatísticas disponíveis envolvendo um grande número de casos, como a *Global Cancer Statistics* (Parkin *et al.*, 2002) e a *SEER Cancer Statistics* (Altekruse *et al.*, 2009), ambas com predominância da incidência de CECP em homens, especialmente em portadores de carcinomas de laringe. Uma possível explicação para esse achado é o maior consumo de álcool e tabaco por indivíduos do sexo masculino e a maior resistência para busca de serviços médicos entre eles.

Entre os pacientes, 95,2% dos casos estudados referiram consumo de tabaco e 88,8% tanto de tabaco como de álcool. Esses valores reforçam o fato bem conhecido de que o estilo de vida é de extrema importância para o risco de CECP. Diversos estudos da literatura já relataram o uso de tabaco e álcool como fator etiológico da doença e descreveram seu efeito multiplicativo quando ocorre a associação de ambos, que é estimada em 75% de todos os casos (Vineis *et al.*, 2004; Blot *et al.*, 1988; Argiris *et al.*, 2008).

Outro fator associado ao câncer é a idade. Um aumento de mutações somáticas ocorre com o envelhecimento, resultado da exposição cumulativa a agentes endógenos e exógenos que lesam o DNA. Argiris e colaboradores (2008) citam que a idade média no momento do diagnóstico de CECP é em torno de 60 anos, muito próxima da idade média verificada neste estudo (56,6 anos). Entre as amostras utilizadas, apenas duas foram procedentes de pacientes com idades inferiores a 40 anos. Um fato interessante é que ambos nunca tinham consumido tabaco ou álcool e seus tumores ao diagnóstico foram classificados no estágio IV. Lajer e von Buchwald (2010) relatam que pacientes com CECP associados à infecção por HPV tendem a ser mais jovens, sem histórico de consumo de tabaco e álcool, frequentemente com tumores em estágios mais elevados, grandes linfonodos metastáticos, mas melhor prognóstico. Essa associação entre HPV e CECP explica a incidência desses tumores em pessoas mais jovens, sendo o vírus transmitido principalmente por práticas sexuais, o que infere importantes implicações em prevenção, diagnóstico e tratamento nesses casos.

O número de casos com tumores metastáticos selecionados para estudos de validação foi aproximadamente o mesmo de não metastáticos (30 e 33, respectivamente). Esse total foi consequência da seleção realizada com o objetivo de uma representação equitativa dos dois grupos, que exibem características clínicas e prognósticos distintos. Entre essas diferenças, a presença de metástases em linfonodos regionais permanece como um dos mais importantes fatores prognósticos e representa um achado crítico para o delineamento do tratamento dos pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço (Pantel e Brakenhoff, 2004). Tal tratamento inclui esvaziamento cervical nos casos N+ que, dependendo de seu alcance, possui implicações sobre a qualidade de vida e sobre a morbimortalidade, geralmente elevada nesse grupo (Steeg e Theodorescu, 2008).

As amostras de tecido tumoral e margem cirúrgica utilizadas apresentaram boa qualidade de RNA, que é dependente de um procedimento adequado de coleta e armazenamento de amostras e fundamental para análises de expressão gênica. O presente estudo utilizou material obtido com protocolo otimizado pelo consórcio colaborativo GENCAPO (Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço) do projeto temático FAPESP “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço”. Nesse projeto, o tempo entre a retirada do espécime cirúrgico e seu armazenamento inicial em nitrogênio líquido foi padronizado em, no máximo, 30 minutos. Embora o procedimento cirúrgico envolva etapas não controláveis nas quais a peça perde oxigenação por causa do pinçamento de artérias durante sua retirada, a maioria das amostras desse projeto exhibe boa qualidade. Além desse cuidado com o processamento e o armazenamento do material, cada caso esteve ligado a um grande número de informações clínicas, anatomopatológicas e de seguimento, que são de grande importância para análises de correlação com os achados de expressão gênica.

Para as etapas de validação dos genes de interesse, além das amostras de tumores primários, foram também utilizadas quatro linhagens celulares, todas procedentes de pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço. Para controle normal no caso das linhagens, foram desenvolvidas culturas primárias de queratinócitos bucais humanos obtidos de indivíduos saudáveis, cultivados sobre camada de sustentação de fibroblastos murinos mitoticamente inativados por raio-X.

Os resultados obtidos a partir das curvas de crescimento dos fibroblastos murinos irradiados mostraram que a proliferação das células foi inibida de forma eficaz em ambas as doses utilizadas (60 e 80 Gy) e mantiveram-se em cultura por período relativamente longo, confirmando sua potencialidade de utilização como camada de sustentação para a cultura de queratinócitos. Foi escolhida a dose de 60 Gy para a confecção da camada porque as células mantiveram-se mais tempo em cultura. O declínio do número de células irradiadas com a dose de 80 Gy foi maior, conforme evidenciado nos experimentos.

A utilização da camada de sustentação possibilitou a propagação dos queratinócitos em culturas e contribuiu positivamente para sua adesão e proliferação. A camada de sustentação, além de fornecer suporte físico permitindo o desenvolvimento dos queratinócitos formadores de colônias ou clonogênicos, é capaz de sintetizar substâncias essenciais para o desenvolvimento de células epiteliais. Dessa maneira, é possível prolongar a cultura dos queratinócitos sem que ocorram etapas de diferenciação celular ou diminuição de potencial proliferativo.

Os queratinócitos orais derivados de indivíduos saudáveis, quando em cultura, apresentam características de normalidade, incluindo tempo finito de vida. Sua longevidade em cultura é variável, com relatos de 4 a 10 passagens em um período de até três meses (Freshney e Freshney, 2002). Para expansão, as células raramente são cultivadas além da terceira ou quarta passagem, porque o número de novas células equipara aquele das células que morrem. A eficiência clonal diminui de 40 a 90% entre as passagens 1 e 3. Com o meio de cultura adequadamente enriquecido, os queratinócitos crescem em colônias macroscópicas contendo milhares de células, que podem ser usadas em experimentos ou subcultivadas por pelo menos 80 duplicações da população no caso de células de adultos (Freshney e Freshney, 2002) e mais de 140 duplicações se os doadores de tecido forem recém-nascidos (Rheinwald e Green, 1977).

No presente estudo, diversos hormônios e outros fatores solúveis foram adicionados ao meio de cultura de queratinócitos, entre eles hidrocortisona, toxina colérica, fator de crescimento epidérmico, insulina, triiodotironina e adenina. A hidrocortisona é essencial para manter a taxa de crescimento, a morfologia da colônia e a diferenciação de queratinócitos (Rheinwald e Green, 1975), e também previne a deterioração da camada de sustentação (Pera e Gorman, 1984). A toxina colérica contrapõe a tendência dos queratinócitos de aumentarem o tamanho celular, por meio da elevação dos níveis de AMP cíclico (Green, 1978), possivelmente retardando sua diferenciação terminal (Sun e Green, 1976; Barrandon e Green, 1985). O fator de crescimento epidérmico (EGF) antagoniza a aglomeração das células no centro das colônias de queratinócitos (Rheinwald e Green, 1977), estimulando a duplicação e a migração celular para fora desse centro, consequentemente aumentando a longevidade e a quantidade de células na colônia (Barrandon e Green, 1987). O EGF parece também antagonizar a diferenciação terminal e aumentar o tamanho das populações em divisão e clonogênicas por um mecanismo distinto da toxina colérica (Rheinwald e Green, 1977; Green, 1978), sendo que o efeito desses dois agentes juntos é superior ao de cada um isoladamente (Green, 1978). Com a associação de hidrocortisona, toxina colérica e EGF, ocorre um aumento na fração clonogênica, na taxa de crescimento e no tempo de vida das células (Rheinwald, 1980; Green, 1980), possibilitando um grande número de queratinócitos humanos normais a partir de uma pequena amostra de tecido. A insulina e a

triiodotironina (T3) reduzem a necessidade de soro fetal bovino de 20% para 10% e, mesmo na presença de soro com qualidade não ideal, aumentam a taxa de crescimento (Freshney e Freshney, 2002). A adenina inibe a proliferação de fibroblastos contaminantes e, conseqüentemente, a presença indesejada dessas células na cultura de queratinócitos (Breidahl *et al.*, 1989).

Os queratinócitos cultivados foram utilizados como referência para as análises de expressão gênica em linhagens celulares procedentes de carcinomas de cabeça e pescoço, da mesma forma que os dados de margens cirúrgicas serviram de comparação para aqueles obtidos de tumores primários.

Para as análises de expressão gênica, foram selecionados genes identificados em um trabalho anterior do grupo, que desenvolveu uma abordagem estatística para análise de dados de bibliotecas SAGE de carcinomas de laringe metastáticos e não metastáticos e de uma biblioteca de tecido normal (Silveira *et al.*, 2008). A partir de um total de mais de 50 mil tags diferencialmente expressas, foi criada uma lista contendo os genes com valores mais discriminativos na comparação de tumores N+ e N0 e margens cirúrgicas (Anexo 2). Aqueles com envolvimento potencial no processo ou no fenótipo neoplásico ou com um papel ainda não esclarecido na tumorigênese de cabeça e pescoço foram selecionados. Desses, quatro genes cujas funções estavam relacionadas com diferenciação/estrutura da epiderme e adesão celular seguiram para análises de validação: citoqueratina 6A (*KRT6A*), citoqueratina 19 (*KRT19*), mesotelina (*MSLN*) e calicreína 8 (*KLK8*). Como os dados de SAGE foram gerados a partir de carcinomas de laringe, os ensaios de validação foram realizados em amostras de tumores de laringe e também em dois grupos externos de outros sítios, língua e soalho de boca, e em linhagens de carcinomas de diferentes sítios.

Segundo os dados obtidos por Silveira e colaboradores (2008), ocorreu um aumento significativo de expressão do gene *KRT6A* em tumores de laringe N0 em relação aos N+. Para *KRT19*, esses autores observaram uma situação inversa, com aumento em N+ em relação a N0, porém com aumento muito maior em normal versus N0.

No presente estudo, os transcritos de *KRT6A* não foram expressos nas células Hep-2, uma linhagem celular originalmente descrita como sendo de carcinoma de laringe, e exibiram baixos níveis nas demais linhagens. Também não foram observadas as diferenças esperadas entre tumores de laringe N+ e N0, ou para os demais tipos de tumores, exceto uma redução significativa de transcritos em tumores de língua metastáticos, um grupo com poucas amostras. A explicação para os achados deve estar no fato das bibliotecas SAGE terem sido geradas a partir de apenas uma amostra N+ e uma N0, não representando o que ocorre na maioria dos casos.

Na comparação do total de amostras de tumores com as amostras de margens cirúrgicas, foi observada elevação e diminuição de expressão de *KRT6A* em 33% e 21% dos

casos, respectivamente, portanto com uma pequena tendência para o grupo exibindo altos níveis.

Para o gene *KRT19*, as linhagens mostraram redução de níveis, exceto as células de tonsila que não exibiram diferença em relação aos queratinócitos normais. O mesmo foi observado nos tumores primários, principalmente para os de laringe, soalho de boca N+ e língua N+, que exibiram redução significativa de expressão em relação às margens cirúrgicas, embora sem diferenças entre casos metastáticos e não metastáticos.

A relação das queratinas com o processo neoplásico pode ser avaliada pela análise de queratinopatias e camundongos *knockout*, que mostram o impacto dessas proteínas em arquitetura, tamanho e proliferação celular. Seu perfil de fosforilação e a identificação de proteínas associadas também fornecem dados para compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais elas atuam (Magin *et al.*, 2007). Por exemplo, os dados da literatura têm referido a conexão dos filamentos de queratina com as adesões focais em lamelipódios e com os sistemas de actina e microtúbulos, sugerindo sua importância na adaptação da célula a mudanças estruturais durante o desenvolvimento, a migração e a formação de metástases (Wöll *et al.*, 2005; Windoffer *et al.*, 2006). Em relação à fosforilação dos polipeptídeos de queratina, seu perfil afeta o status de polimerização (Omary *et al.*, 1998) e também a susceptibilidade a situações adversas e apoptose. Essas características levaram Ku e Omary (2006) a sugerir que as queratinas, durante o estresse, agem como “esponja para fosfato”, absorvendo o efeito da quinases ativadas e protegendo a célula de lesões.

Consequências funcionais de alterações transitórias na composição de queratinas também são importantes. Como referido previamente, o desequilíbrio nas proporções de heterodímeros de queratinas, no caso K6/K16, altera o potencial migratório dos queratinócitos, o que pode ter importantes implicações na sua capacidade migratória (Trost *et al.*, 2010) e em metástases. Seria, portanto, esperado que uma alteração de expressão de *KRT6A* fosse observado em tumores, especialmente nos mais agressivos. Os resultados obtidos no presente trabalho, embora negativos para essa relação, podem ser consequência da presença ou ausência de outras queratinas, ou de sua fosforilação, alternativas que merecem ser melhor investigadas.

Em relação à *KRT19*, ao contrário dos dados deste estudo, alguns trabalhos mostraram aumento de expressão de transcritos e/ou de seu produto em carcinomas orais e sua correlação com baixo grau de diferenciação (Ram Prasad *et al.*, 2005), recorrência e baixa sobrevida (Zhong *et al.*, 2007). Tao e colaboradores (2006) também observaram níveis elevados de transcritos da citoqueratina 19 em linfonodos de pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. No conjunto de 31 pacientes analisados,

apenas um era portador de lesão de laringe e sete de cavidade oral, o que pode ser responsável pelas diferenças com os resultados do presente estudo, que incluiu 29 casos de laringe e 34 de cavidade oral. De qualquer modo, o estudo de Tao e colaboradores demonstrou a sensibilidade da técnica de PCR em tempo real para detecção de células epiteliais, potencialmente micrometástases, em linfonodos.

Em outros tumores epiteliais, como os carcinomas epidermóides cutâneos, a queratina 19 mostra expressão elevada. Esse resultado parece estar associado com características de célula tronco ou a um estado de descomprometimento com a diferenciação terminal (Chen *et al.*, 2008), um achado que também já foi observado em lesões pré-malignas orais (Lindberg e Rheinwald, 1989).

Outro gene cuja expressão foi avaliada neste trabalho foi o *MSLN*. De acordo com Silveira e colaboradores (2008), ocorre um aumento de expressão da mesotelina nos tumores de laringe N+ em relação aos N0 e aos tecidos normais. Os dados obtidos no presente estudo mostraram um perfil variável em linhagens celulares, com níveis elevados em células de laringe e orofaringe. Em tumores primários, foi observada uma redução de expressão significativa nos tumores de laringe e uma tendência para aumento nos de soalho de boca. Com estratificação quanto ao sítio e à presença de metástases, o aumento se manteve nos casos de soalho de boca N0 do mesmo modo que a redução nos casos de laringe.

O aumento de expressão da mesotelina já foi observado em diversos tumores, como câncer pancreático, de ovário e mesotelioma (Chang e Pastan, 1996), bem como em câncer de cabeça e pescoço, vulva, endométrio, pulmão, fígado e esôfago (Chang *et al.*, 1992; Ordonez, 2003; Miettinen e Sarlomo-Rikala, 2003). Uma forte imunorreatividade para a mesotelina em tecidos normais está restrita às células mesoteliais que limitam a pleura, o pericárdio e o peritônio.

Segundo os dados de ESTs do UniGene, não há expressão de mesotelina em tecidos normais de laringe e boca ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene?log\\$=breadcrumbs](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene?log$=breadcrumbs)). Contudo, nas amostras de margens cirúrgicas analisadas, apenas 3 não exibiram transcritos do gene *MSLN*. Uma possibilidade é que, apesar da avaliação de todas as amostras por um patologista e da aparente morfologia normal, as margens podem conter alterações genéticas e/ou epigenéticas. Essa possibilidade é explicada pelo conceito de cancerização de campo de Slaughter *et al.* (1953), que propõe a transformação neoplásica em múltiplos grupos celulares de um mesmo tecido, sob o estresse da atividade regional de um carcinógeno. Segundo esses autores existe um tecido “pré-canceroso” ao redor do tumor primário cuja persistência após ressecção cirúrgica pode explicar o aumento de taxas de recorrência nos pacientes. Realmente, quando um CECP primário é comparado com um segundo tumor em

outro sítio do trato aerodigestivo superior, padrões idênticos de danos genéticos são detectados (Bedi *et al.*, 1996; Worsham *et al.*, 1995; Scholes *et al.*, 1998; Leong *et al.*, 1998). Provavelmente, em algum momento após a sua transformação, as células que adquiriram alterações em seu DNA migram para preencher espaços adjacentes de mucosa, acumulando outras mutações, adquirindo vantagens adicionais de crescimento e, finalmente, transformando-se em subclones agressivos separados pelo tempo e espaço (Califano *et al.*, 2000).

No momento, os resultados da análise histopatológica convencional de seções congeladas de tecido são utilizados para guiar os clínicos no tratamento e na estimativa de desfechos para o paciente com CECP. Entretanto, a natureza subjetiva dessa análise e a alta taxa de recorrência observada colocam limitações para os resultados. No futuro, quando alterações moleculares específicas e suas contribuições para o fenótipo tumoral forem identificadas, sua detecção poderá ser empregada para avaliar as margens cirúrgicas e o comportamento da lesão (Kim e Califano, 2004). Levando em conta os pontos levantados acima, a margem cirúrgica poderia apresentar expressão elevada de *MSLN* e interferir nas análises comparativas com as amostras tumorais.

A função biológica da mesotelina ainda não é clara, mas existem indícios de sua participação em processos ligados a proliferação celular, diferenciação, apoptose (Prieve e Moon, 2003; Bharadwaj *et al.*, 2008), adesão (Rump *et al.*, 2004), resistência à quimioterapia (Cheng *et al.*, 2009) e metástase (Gubbels *et al.*, 2006; Uehara *et al.*, 2008)

O quarto gene selecionado para ensaios de validação foi o *KLK8*. No trabalho de Silveira e colaboradores (2008), esse gene mostrou expressão reduzida em tumor de laringe metastático em relação ao não metastático. Entre as amostras analisadas, a maioria das linhagens celulares mostrou redução significativa de expressão de *KLK8*, o que também foi observado nas amostras de língua N+, ao contrário de soalho de boca N0.

A calicreína 8 já foi observada com níveis elevados em células e fluidos de diferentes neoplasias (Underwood *et al.*, 1999; Gan *et al.*, 2000; Kishi *et al.*, 2003; Cané *et al.*, 2004; Yousef *et al.*, 2004) e níveis reduzidos em outras (Yousef *et al.*, 2004). Em carcinomas de cabeça e pescoço, os dados são também controversos, com diminuição de expressão em metástases linfonodais (Liu *et al.*, 2008) ou aumento nas amostras tumorais (Pettus *et al.*, 2009).

Embora as enzimas proteolíticas participem geralmente da progressão neoplásica, degradando a matriz extracelular, tem sido observada expressão elevada de calicreína 8 em linhagens celulares de baixa invasividade e associada com bom prognóstico em câncer de pulmão de células não-pequenas (Sher *et al.*, 2006) e em câncer de ovário (Shigemasa *et al.*, 2004; Borgoño *et al.*, 2006). Vários trabalhos referem o efeito dessa protease na adesão

e migração (Tani *et al.*, 2001), na degradação de algumas proteínas da matriz (Rajapakse *et al.*, 2005) e na ativação de metaloproteases (Ohler *et al.*, 2010).

Sher e colaboradores (2006) sugerem que esse efeito é decorrente da degradação da fibronectina da matriz pela calicreína 8. Os fragmentos dessa clivagem são potentes inibidores de proliferação de células endoteliais, exercendo portanto um efeito antiangiogênico. Além disso, a fibronectina interage com integrinas e, dependendo do tipo de complexo formado, os efeitos sobre migração/invasão podem ser opostos.

Os resultados do presente trabalho em CECs de língua e soalho de boca também estão de acordo com a idéia de que níveis mais altos de KLK8 em N0 podem indicar melhor prognóstico, considerando que a ausência de metástases em linfonodos regionais é um dos mais importantes fatores para um desfecho favorável (Pantel e Brakenhoff, 2004).

Em resumo, os ensaios de validação em CECs por RT-PCR em tempo real dos genes *KRT6A*, *KRT19*, *MSLN* e *KLK8*, previamente observados com expressão alterada em análise de bibliotecas SAGE de tumores metastáticos e não metastáticos de laringe, mostraram resultados compatíveis com o esperado em alguns casos, mas revelaram também um perfil diferente daquele descrito na literatura em outros tumores. Considerando a função dos genes de interesse, esses achados merecem ser melhor investigados.

As abordagens utilizadas para identificar eventos metabólicos essenciais em câncer incluem a manipulação da expressão de genes de interesse em linhagens celulares e a determinação de seus efeitos em proliferação, migração, invasividade e em outros processos. Entretanto, o sucesso dessas abordagens depende da seleção de alguns genes promissores a partir de um grande número de candidatos, identificados por técnicas de larga escala. Uma análise alternativa é a identificação de genes que possuem expressão alterada em tecido tumoral versus tecido normal correspondente (Chen *et al.*, 2004). O grande problema é selecionar os parâmetros que definem a amostra normal.

Os tecidos aparentemente normais de margens cirúrgicas são retirados a uma distância de alguns centímetros do tumor e podem estar contaminados por células inflamatórias em diferentes níveis, como ocorre em carcinomas de cabeça e pescoço, ou por células com alterações genéticas ou definitivamente tumorais. Esse último evento não deve ser raro considerando as taxas de recorrência local de 50% nesses pacientes, mesmo com margens cirúrgicas microscopicamente negativas (Nathan *et al.*, 2002). Se esses tecidos forem utilizados para comparações de expressão gênica, o valor obtido em tumores pode estar sub ou superestimado. Portanto, é importante que a elaboração das conclusões do trabalho seja feita com grande cautela.

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho estão relacionadas a seguir:

1. A proliferação de fibroblastos murinos é inibida com doses de 60 Gy de raios-X, o que permite sua utilização como camada alimentadora em culturas de queratinócitos.
2. Os queratinócitos bucais humanos normais crescem em camada de sustentação de fibroblastos irradiados e em meio de cultura enriquecido com hidrocortisona, toxina colérica, fator de crescimento epidérmico, insulina, triiodotironina e adenina.
3. Na comparação pareada de amostras de margens cirúrgicas com amostras de carcinomas epidermóides primários de língua, soalho de boca e laringe procedentes de pacientes, na sua maioria, do sexo masculino, fumantes e etilistas e com idades superiores a 40 anos, ocorre (a) redução de expressão do gene *KRT6A* em tumores de língua metastáticos; (b) redução de expressão do gene *KRT19* em tumores de laringe, independentemente do status linfonodal, bem como em tumores de soalho de boca e língua metastáticos; (c) redução de expressão do gene *MSLN* nos tumores de laringe, independentemente da presença de metástases regionais, e aumento nos tumores de soalho de boca não metastático; (d) redução de expressão do gene *KLK8* em tumores de língua N+ e aumento em tumores de soalho de boca N0.
4. Na comparação com queratinócitos de gengiva cultivados, as amostras de linhagens celulares procedentes de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço exibem (a) redução ou ausência de expressão do gene *KRT6A*; (b) redução de expressão do gene *KRT19* na maioria das linhagens; (c) perfil variável de expressão para o gene *MSLN*; (d) redução de expressão do gene *KLK8* na maioria das linhagens.
5. A metodologia de SAGE é uma importante fonte de informações sobre o câncer, mas seus dados necessitam de validação por outras técnicas em maior número de casos.
6. Os dados obtidos no presente estudo e os dados da literatura sugerem o gene *KLK8* como potencial alvo para estudos funcionais posteriores.

RESUMO

Os carcinomas de cabeça e pescoço (CECPs) compreendem um grupo de tumores que atingem vários sítios do trato aerodigestivo superior, incluindo cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. Esses carcinomas são clinicamente heterogêneos e resultam de modificações cumulativas em genes que regulam proliferação, migração celular e apoptose. São estimados aproximadamente 500.000 novos casos de CECP anualmente no mundo. No Brasil, cerca de 14.000 novos casos são esperados em 2010, somente para cavidade oral. As taxas de morbidade e mortalidade e as limitações das estratégias terapêuticas enfatizam a necessidade de um melhor entendimento dos padrões moleculares envolvidos na iniciação e na progressão desses tumores, e de abordagens preventivas e terapêuticas efetivas. Infelizmente, apesar da intensa pesquisa nessa área, poucos marcadores moleculares são conhecidos que exibam sensibilidade e especificidade para diagnóstico e prognóstico de CECP. Em um estudo prévio, nós avaliamos dados de três bibliotecas SAGE de carcinoma de laringe com a finalidade de identificar eventos associados ao desenvolvimento e à agressividade de CECP. Utilizando abordagens estatísticas e de Bioinformática, nós identificamos 60 genes com expressão elevada ou reduzida em tumores metastáticos versus não-metastáticos e em ambos os grupos versus tecidos normais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de quatro genes desta lista, os das queratinas 6A (*KRT6A*) e 19 (*KRT19*), da mesotelina (*MSLN*) e da calicreína 8 (*KLK8*), em um conjunto de 63 carcinomas primários de cabeça e pescoço e suas margens cirúrgicas e em quatro linhagens celulares (Hep-2, FaDu, SCC9 e UM-SSC-38) por RT-PCR em tempo real. Como amostra de referência para as linhagens, foram utilizados queratinócitos orais humanos normais, cultivados sobre uma camada de sustentação de fibroblastos irradiados. Todos os genes exibiram níveis de transcritos reduzidos ou ausentes nas linhagens celulares, exceto *MSLN*, que mostrou um padrão irregular de expressão. Em tumores primários, os genes *KRT19* e *MSLN* apresentaram expressão diminuída em laringe, o mesmo sendo observado para o gene *KLK8* em tumores de língua metastático. Além disso, foi detectada expressão elevada de *MSLN* e *KLK8* em tumores não metastáticos de soalho de boca e expressão reduzida de *KRT19* em tumores de soalho de boca e língua metastáticos. Os resultados levantam questões sobre o papel desses genes em processos biológicos associados com a tumorigênese de cabeça e pescoço e sobre sua participação no fenótipo neoplásico.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) encompass a group of tumors that affect a variety of sites in the upper aero-digestive tract, including oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. These carcinomas are clinically heterogeneous and result from cumulative changes in genes that regulate cell proliferation, migration and death. It is estimated that approximately 500,000 new cases of HNSCC are diagnosed worldwide each year. In Brazil, about 14,000 new cases are expected in the year 2010, only in oral cavity. The morbidity and mortality rates and the limitations of therapeutic strategies emphasize the need for a better understanding of the molecular pathways involved in the initiation and progression of these tumors and for effective preventive and therapeutic approaches. Unfortunately, despite intense research, few molecular markers are known to exhibit sensitivity and specificity for the diagnosis or prognosis of HNSCC. In a previous study, we evaluated data from three SAGE libraries of larynx carcinoma in order to identify events associated with the development and aggressiveness of HNSCCs. Using statistical and bioinformatic tools, we identified sixty top-up and 60 top-downregulated genes in metastatic versus non-metastatic tumors and in both these tumors versus normal tissues. The objective of the present study was to evaluate the expression of four genes from this list, keratin 6A (*KRT6A*), keratin 19 (*KRT19*), mesothelin (*MSLN*) and kallikrein 8 (*KLK8*), in a set of 63 primary carcinomas of head and neck and their surgical margins and in four cell lines (Hep-2, FaDu, SCC9 and UM-SSC-38) by real time RT-PCR. As a reference sample for cell lines, we used normal human oral keratinocytes grown on irradiated fibroblast feeder layer. All genes exhibited no or decreased levels of transcripts in the cell lines, except *MSLN*, which displayed an irregular pattern of expression. In primary tumors, *KRT19* and *MSLN* genes were downregulated in larynx, and *KLK8* in metastatic tongue tumors. In addition, *MSLN* and *KLK8* were upregulated in non-metastatic floor of the mouth tumors and *KRT19* was down regulated in metastatic floor of the mouth and tongue tumors. The results open questions about the role of these genes on biological processes related to head and neck tumorigenesis and on neoplastic phenotype.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldington, S., M. Harwood, *et al.* Cannabis use and cancer of the head and neck: case-control study. Otolaryngol Head Neck Surg, v.138, n.3, Mar, p.374-80. 2008.

Altekruse Sf, K. C., Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto a, Eisner Mp, Lewis Dr, Cronin K, Chen Hs, Feuer Ej, Stinchcomb Dg, Edwards Bk. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. 2010.

Andreasen, P. A., R. Egelund, *et al.* The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. Cell Mol Life Sci, v.57, n.1, Jan 20, p.25-40. 2000.

Argiris, A., M. V. Karamouzis, *et al.* Head and neck cancer. Lancet, v.371, n.9625, May 17, p.1695-709. 2008.

Balbo, S., M. Hashibe, *et al.* N2-ethyldeoxyguanosine as a potential biomarker for assessing effects of alcohol consumption on DNA. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.17, n.11, Nov, p.3026-32. 2008.

Balz, V., K. Scheckenbach, *et al.* Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. Cancer Res, v.63, n.6, Mar 15, p.1188-91. 2003.

Bambang, I. F., D. Lu, *et al.* Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. Exp Cell Res, v.315, n.11, Jul 1, p.1964-74. 2009.

Barak, V., H. Goike, *et al.* Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Biochem, v.37, n.7, Jul, p.529-40. 2004.

Barrandon, Y. e H. Green. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.16, Aug, p.5390-4. 1985.

Barrandon, Y. e H. Green. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. Cell, v.50, n.7, Sep 25, p.1131-7. 1987.

Becker-Pauly, C., M. Howel, *et al.* The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. J Invest Dermatol, v.127, n.5, May, p.1115-25. 2007.

Bedi, G. C., W. H. Westra, *et al.* Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. Cancer Res, v.56, n.11, Jun 1, p.2484-7. 1996.

Bera, T. K. e I. Pastan. Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction. Mol Cell Biol, v.20, n.8, Apr, p.2902-6. 2000.

Bergkvist, A., V. Rusnakova, *et al.* Gene expression profiling--Clusters of possibilities. Methods, v.50, n.4, Apr, p.323-35.

Berthiller, J., Y. C. Lee, *et al.* Marijuana smoking and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.18, n.5,

May, p.1544-51. 2009.

Bharadwaj, U., M. Li, *et al.* Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via activation of signal transducer and activator of transcription protein 3. Mol Cancer Res, v.6, n.11, Nov, p.1755-65. 2008.

Blot, W. J., J. K. Mclaughlin, *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res, v.48, n.11, Jun 1, p.3282-7. 1988.

Boeing, H., T. Dietrich, *et al.* Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aero-digestive tract: the prospective EPIC-study. Cancer Causes Control, v.17, n.7, Sep, p.957-69. 2006.

Borgoño, C. A. e E. P. Diamandis. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. Nat Rev Cancer, v.4, n.11, Nov, p.876-90. 2004.

Borgoño, C. A., T. Kishi, *et al.* Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. Clin Cancer Res, v.12, n.5, Mar 1, p.1487-93. 2006.

Borgoño, C. A., I. P. Michael, *et al.* Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. Mol Cancer Res, v.2, n.5, May, p.257-80. 2004.

Bosetti, C., S. Gallus, *et al.* Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. Am J Epidemiol, v.167, n.4, Feb 15, p.468-73. 2008.

Bragulla, H. H. e D. G. Homberger. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. J Anat, v.214, n.4, Apr, p.516-59. 2009.

Breidahl, A. F., R. T. Judson, *et al.* Review of keratinocyte culture techniques: problems of growing skin. Aust N Z J Surg, v.59, n.6, Jun, p.485-97. 1989.

Brembeck, F. H. e A. K. Rustgi. The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. J Biol Chem, v.275, n.36, Sep 8, p.28230-9. 2000.

Brennan, J. A., J. O. Boyle, *et al.* Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, v.332, n.11, Mar 16, p.712-7. 1995.

Califano, J., P. Van Der Riet, *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res, v.56, n.11, Jun 1, p.2488-92. 1996.

Califano, J., W. H. Westra, *et al.* Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. Clin Cancer Res, v.6, n.2, Feb, p.347-52. 2000.

Calmon, M. F., R. V. Rodrigues, *et al.* Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. Neoplasia, v.11, n.12, Dec, p.1329-39. 2009.

Cancela, M. C., L. Voti, *et al.* Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. Head Neck, v.32, n.3, Mar, p.357-67.

Cané, S., E. Bignotti, *et al.* The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-14 (KLK8/Neuropilin/Ovasin) is highly overexpressed in cervical cancer. Am J Obstet Gynecol, v.190, n.1, Jan, p.60-6. 2004.

Capaccio, P., G. Pruneri, *et al.* Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. Head Neck, v.22, n.3, May, p.234-40. 2000.

Chang, K. e I. Pastan. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.1, Jan 9, p.136-40. 1996.

Chang, K., I. Pastan, *et al.* Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. Int J Cancer, v.50, n.3, Feb 1, p.373-81. 1992.

Chang, S. S., W. W. Jiang, *et al.* MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer, v.123, n.12, Dec 15, p.2791-7. 2008.

Chen, L. C., C. Y. Hao, *et al.* Alteration of gene expression in normal-appearing colon mucosa of APC(min) mice and human cancer patients. Cancer Res, v.64, n.10, May 15, p.3694-700. 2004.

Chen, S., M. Takahara, *et al.* Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma. Br J Dermatol, v.159, n.4, Sep, p.952-5. 2008.

Chen, T. F., G. L. Jiang, *et al.* CK19 mRNA expression measured by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer treated by chemo-radiation: an independent prognostic factor. Lung Cancer, v.56, n.1, Apr, p.105-14. 2007.

Cheng, W. F., C. Y. Huang, *et al.* High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. Br J Cancer, v.100, n.7, Apr 7, p.1144-53. 2009.

Chow, L. T., T. R. Broker, *et al.* The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. APMIS, v.118, n.6-7, Jun, p.422-49.

Curado, M. P. e M. Hashibe. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol, v.21, n.3, May, p.194-200. 2009.

Dasgupta, S., P. K. Tripathi, *et al.* Identification of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol, v.42, n.3, Mar, p.306-16. 2006.

D'souza, G., A. R. Kreimer, *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med, v.356, n.19, May 10, p.1944-56. 2007.

Ferlay J, B. F., Pisani P, Parkin Dm. Globocan 2002 2004.

Foulkes, W. D., J. S. Brunet, *et al.* Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. BMJ, v.313, n.7059, Sep 21, p.716-21. 1996.

Freedman, N. D., Y. Park, *et al.* Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. Int J Cancer, v.122, n.10, May 15, p.2330-6. 2008.

Freshney, R. I., Freshney, M. G. Culture of epithelial cells. New York: Wiley-Liss. 2002

Gan, L., I. Lee, *et al.* Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. Gene, v.257, n.1, Oct 17, p.119-30. 2000.

Gilbert, R. W. Innovation in the surgical management of head and neck tumors. Hematol Oncol Clin North Am, v.22, n.6, Dec, p.1181-91, viii-ix. 2008.

Gollin, S. M. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. Head Neck, v.23, n.3, Mar, p.238-53. 2001.

Green, H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. Cell, v.15, n.3, Nov, p.801-11. 1978.

Green, H. The keratinocyte as differentiated cell type. Harvey Lect, v.74, p.101-39. 1980.

Gubbels, J. A., J. Belisle, *et al.* Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. Mol Cancer, v.5, n.1, p.50. 2006.

Guha, N., P. Boffetta, *et al.* Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. Am J Epidemiol, v.166, n.10, Nov 15, p.1159-73. 2007.

Ha, P. K., N. E. Benoit, *et al.* A transcriptional progression model for head and neck cancer. Clin Cancer Res, v.9, n.8, Aug 1, p.3058-64. 2003.

Ha, P. K., S. S. Chang, *et al.* Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. Oral Oncol, v.45, n.4-5, Apr-May, p.335-9. 2009.

Hamakawa, H., Y. Bao, *et al.* Cytokeratin expression in squamous cell carcinoma of the lung and oral cavity: an immunohistochemical study with possible clinical relevance. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.85, n.4, Apr, p.438-43. 1998.

Hashibe, M., P. Boffetta, *et al.* Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.15, n.4, Apr, p.696-703. 2006.

Hashibe, M., P. Brennan, *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.18, n.2, Feb, p.541-50. 2009.

Hashibe, M., H. Morgenstern, *et al.* Marijuana use and the risk of lung and upper aerodigestive tract cancers: results of a population-based case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.15, n.10, Oct, p.1829-34. 2006.

Hassan, R. e M. Ho. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. Eur J Cancer, v.44, n.1, Jan, p.46-53. 2008.

Herrero, R., X. Castellsague, *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. J Natl Cancer Inst, v.95, n.23, Dec 3, p.1772-83. 2003.

Hickerson, R. P., D. Leake, *et al.* Rapamycin selectively inhibits expression of an inducible keratin (K6a) in human keratinocytes and improves symptoms in pachyonychia congenita patients. J Dermatol Sci, v.56, n.2, Nov, p.82-8. 2009.

Hiraki, A., K. Matsuo, *et al.* Teeth loss and risk of cancer at 14 common sites in Japanese. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.17, n.5, May, p.1222-7. 2008.

Ho, M., R. Hassan, *et al.* Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. Clin Cancer Res, v.11, n.10, May 15, p.3814-20. 2005.

Hucl, T., J. R. Brody, *et al.* High cancer-specific expression of mesothelin (MSLN) is attributable to an upstream enhancer containing a transcription enhancer factor dependent MCAT motif. Cancer Res, v.67, n.19, Oct 1, p.9055-65. 2007.

Hunter, K. D., E. K. Parkinson, *et al.* Profiling early head and neck cancer. Nat Rev Cancer, v.5, n.2, Feb, p.127-35. 2005.

Ignatiadis, M., V. Georgoulas, *et al.* Micrometastatic disease in breast cancer: clinical implications. Eur J Cancer, v.44, n.18, Dec, p.2726-36. 2008.

Ignatiadis, M., M. Perraki, *et al.* Molecular detection and prognostic value of circulating cytokeratin-19 messenger RNA-positive and HER2 messenger RNA-positive cells in the peripheral blood of women with early-stage breast cancer. Clin Breast Cancer, v.7, n.11, Dec, p.883-9. 2007.

Ishida-Yamamoto, A., T. Senshu, *et al.* Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination. J Invest Dermatol, v.118, n.2, Feb, p.282-7. 2002.

Ishida-Yamamoto, A., H. Takahashi, *et al.* Lessons from disorders of epidermal differentiation-associated keratins. Histol Histopathol, v.17, n.1, Jan, p.331-8. 2002.

Karamouzis, M. V., J. R. Grandis, *et al.* Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. JAMA, v.298, n.1, Jul 4, p.70-82. 2007.

Kim, M. M. e J. A. Califano. Molecular pathology of head-and-neck cancer. Int J Cancer, v.112, n.4, Nov 20, p.545-53. 2004.

Kim, S., P. Wong, *et al.* A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. Nature, v.441, n.7091, May 18, p.362-5. 2006.

Kirihara, T., K. Matsumoto-Miyai, *et al.* Prolonged recovery of ultraviolet B-irradiated skin in neuropsin (KLK8)-deficient mice. Br J Dermatol, v.149, n.4, Oct, p.700-6. 2003.

Kishi, T., L. Grass, *et al.* Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. Cancer Res, v.63, n.11, Jun 1, p.2771-4. 2003.

Kishi, T., L. Grass, *et al.* Human kallikrein 8: immunoassay development and identification in tissue extracts and biological fluids. Clin Chem, v.49, n.1, Jan, p.87-96. 2003.

Kishibe, M., Y. Bando, *et al.* Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. J Biol Chem, v.282, n.8, Feb 23, p.5834-41. 2007.

Klussmann, J. P., J. J. Mooren, *et al.* Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. Clin Cancer Res, v.15, n.5, Mar 1, p.1779-86. 2009.

Koch, W. H. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. Nat Rev Drug

Discov, v.3, n.9, Sep, p.749-61. 2004.

Kojima, T., M. Oh-Eda, *et al.* Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. J Biol Chem, v.270, n.37, Sep 15, p.21984-90. 1995.

Komatsu, N., K. Saijoh, *et al.* Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender. J Invest Dermatol, v.125, n.6, Dec, p.1182-9. 2005.

Komine, M., L. S. Rao, *et al.* Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol, v.116, n.2, Feb, p.330-8. 2001.

Kreimer, A. R., G. M. Clifford, *et al.* Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.14, n.2, Feb, p.467-75. 2005.

Ku, N. O., J. Liao, *et al.* Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. EMBO J, v.17, n.7, Apr 1, p.1892-906. 1998.

Ku, N. O. e M. B. Omary. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. J Cell Biol, v.174, n.1, Jul 3, p.115-25. 2006.

Kuriakose, M. A., W. T. Chen, *et al.* Selection and validation of differentially expressed genes in head and neck cancer. Cell Mol Life Sci, v.61, n.11, Jun, p.1372-83. 2004.

Kuwae, K., K. Matsumoto-Miyai, *et al.* Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples. Mol Pathol, v.55, n.4, Aug, p.235-41. 2002.

Lajer, C. B. e C. Von Buchwald. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. APMIS, v.118, n.6-7, Jun, p.510-9.

Lassen, P., J. G. Eriksen, *et al.* Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol, v.27, n.12, Apr 20, p.1992-8. 2009.

Leong, P. P., B. Rezai, *et al.* Distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst, v.90, n.13, Jul 1, p.972-7. 1998.

Lindberg, K. e J. G. Rheinwald. Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. Am J Pathol, v.134, n.1, Jan, p.89-98. 1989.

Lisovsky, M., K. Patel, *et al.* Immunophenotypic characterization of anal gland carcinoma: loss of p63 and cytokeratin 5/6. Arch Pathol Lab Med, v.131, n.8, Aug, p.1304-11. 2007.

Liu, C. J., T. Y. Liu, *et al.* Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. J Pathol, v.214, n.4, Mar, p.489-97. 2008.

Liu, X., Z. Chen, *et al.* MicroRNA profiling and head and neck cancer. Comp Funct Genomics, p.837514. 2009.

Llewellyn, C. D., N. W. Johnson, *et al.* Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. J Oral Pathol

Med, v.33, n.9, Oct, p.525-32. 2004.

Magin, T. M., P. Vijayaraj, *et al.* Structural and regulatory functions of keratins. Exp Cell Res, v.313, n.10, Jun 10, p.2021-32. 2007.

Mao, L., J. S. Lee, *et al.* Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. Nat Med, v.2, n.6, Jun, p.682-5. 1996.

Margolis, S. S., J. A. Perry, *et al.* Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. Cell, v.127, n.4, Nov 17, p.759-73. 2006.

Marron, M., P. Boffetta, *et al.* Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. Int J Epidemiol, v.39, n.1, Feb, p.182-96.

Martin, C. L., S. C. Reshmi, *et al.* Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma: examination of 31 cell lines and review of the literature. Oral Oncol, v.44, n.4, Apr, p.369-82. 2008.

Martone, T., A. Gillio-Tos, *et al.* Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res, v.13, n.17, Sep 1, p.5089-94. 2007.

Mccaul, J. A., K. E. Gordon, *et al.* Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. Lancet Oncol, v.3, n.5, May, p.280-8. 2002.

Miettinen, M. e M. Sarlomo-Rikala. Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. Am J Surg Pathol, v.27, n.2, Feb, p.150-8. 2003.

Ministério da Saúde: Estimativa 2009: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro:. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer; 2007.

Mitsui, S., N. Tsuruoka, *et al.* A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. Eur J Biochem, v.260, n.3, Mar, p.627-34. 1999.

Moriniere, S. [Epidemiology of head and neck cancer]. Rev Prat, v.56, n.15, Oct 15, p.1637-41. 2006.

Nathan, C. O., N. Amirghahri, *et al.* Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. Laryngoscope, v.112, n.12, Dec, p.2129-40. 2002.

Negri, E., P. Boffetta, *et al.* Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Int J Cancer, v.124, n.2, Jan 15, p.394-401. 2009.

Ohler, A., M. Debela, *et al.* Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. Biol Chem, v.391, n.4, Apr, p.455-60.

Omary, M. B., P. A. Coulombe, *et al.* Intermediate filament proteins and their associated diseases. N Engl J Med, v.351, n.20, Nov 11, p.2087-100. 2004.

- Omary, M. B., N. O. Ku, *et al.* Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. Subcell Biochem, v.31, p.105-40. 1998.
- Ordóñez, N. G. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. Am J Surg Pathol, v.27, n.11, Nov, p.1418-28. 2003.
- Oshima, R. G. Apoptosis and keratin intermediate filaments. Cell Death Differ, v.9, n.5, May, p.486-92. 2002.
- Ozbas, S., H. Dafydd, *et al.* Bone marrow micrometastasis in breast cancer. Br J Surg, v.90, n.3, Mar, p.290-301. 2003.
- Paladini, R. D., K. Takahashi, *et al.* Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. J Cell Biol, v.132, n.3, Feb, p.381-97. 1996.
- Pantel, K. e R. H. Brakenhoff. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer, v.4, n.6, Jun, p.448-56. 2004.
- Parikh, R. R., Q. Yang, *et al.* Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype: the prognostic significance of CK19 expression. Int J Radiat Oncol Biol Phys, v.70, n.1, Jan 1, p.35-42. 2008.
- Parkin, D. M., F. Bray, *et al.* Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, v.55, n.2, Mar-Apr, p.74-108. 2005.
- Pera, M. F. e P. A. Gorman. In vitro analysis of multistage epidermal carcinogenesis: development of indefinite renewal capacity and reduced growth factor requirements in colony forming keratinocytes precedes malignant transformation. Carcinogenesis, v.5, n.5, May, p.671-82. 1984.
- Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, *et al.* Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Pathol, v.59, n.5, May, p.445-53. 2006.
- Pettus, J. R., J. J. Johnson, *et al.* Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Histol Histopathol, v.24, n.2, Feb, p.197-207. 2009.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.
- Pignataro, L., G. Pruneri, *et al.* Clinical relevance of cyclin D1 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol, v.16, n.9, Sep, p.3069-77. 1998.
- Pim, D. e L. Banks. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. APMIS, v.118, n.6-7, Jun, p.471-93.
- Pim, D., V. Tomaic, *et al.* The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. J Virol, v.83, n.19, Oct, p.9863-74. 2009.
- Prieve, M. G. e R. T. Moon. Stromelysin-1 and mesothelin are differentially regulated by Wnt-5a and Wnt-1 in C57mg mouse mammary epithelial cells. BMC Dev Biol, v.3, Apr 7, p.2. 2003.

Rajapakse, S., K. Ogiwara, *et al.* Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins. FEBS Lett, v.579, n.30, Dec 19, p.6879-84. 2005.

Ram Prasad, V. V., N. R. Nirmala, *et al.* Immunohistochemical evaluation of expression of cytokeratin 19 in different histological grades of leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Indian J Dent Res, v.16, n.1, Jan-Mar, p.6-11. 2005.

Rheinwald, J. G. e H. Green. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell, v.6, n.3, Nov, p.331-43. 1975.

Rheinwald, J. G. e H. Green. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. Nature, v.265, n.5593, Feb 3, p.421-4. 1977.

Rocco, J. W. e D. Sidransky. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp Cell Res, v.264, n.1, Mar 10, p.42-55. 2001.

Rodriguez, T., A. Altieri, *et al.* Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. Oral Oncol, v.40, n.2, Feb, p.207-13. 2004.

Roepman, P., L. F. Wessels, *et al.* An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. Nat Genet, v.37, n.2, Feb, p.182-6. 2005.

Rosenblatt, K. A., J. R. Daling, *et al.* Marijuana use and risk of oral squamous cell carcinoma. Cancer Res, v.64, n.11, Jun 1, p.4049-54. 2004.

Rubin Grandis, J., M. F. Melhem, *et al.* Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst, v.90, n.11, Jun 3, p.824-32. 1998.

Rump, A., Y. Morikawa, *et al.* Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. J Biol Chem, v.279, n.10, Mar 5, p.9190-8. 2004.

Safer, J. D., T. M. Crawford, *et al.* A role for thyroid hormone in wound healing through keratin gene expression. Endocrinology, v.145, n.5, May, p.2357-61. 2004.

Saintigny, P., S. Coulon, *et al.* Real-time RT-PCR detection of CK19, CK7 and MUC1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma. Int J Cancer, v.115, n.5, Jul 10, p.777-82. 2005.

Sapkota, A., C. C. Hsu, *et al.* Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. Cancer Causes Control, v.19, n.10, Dec, p.1161-70. 2008.

Schmelz, M., R. Moll, *et al.* Identification of a stem cell candidate in the normal human prostate gland. Eur J Cell Biol, v.84, n.2-3, Mar, p.341-54. 2005.

Schmitt, A. M., M. Anlauf, *et al.* WHO 2004 criteria and CK19 are reliable prognostic markers in pancreatic endocrine tumors. Am J Surg Pathol, v.31, n.11, Nov, p.1677-82. 2007.

Scholes, A. G., J. A. Woolgar, *et al.* Synchronous oral carcinomas: independent or common clonal origin? Cancer Res, v.58, n.9, May 1, p.2003-6. 1998.

Schweizer, J., P. E. Bowden, *et al.* New consensus nomenclature for mammalian keratins. J

Cell Biol, v.174, n.2, Jul 17, p.169-74. 2006.

Scott, F. L., J. Sun, *et al.* SerpinB6 is an inhibitor of kallikrein-8 in keratinocytes. J Biochem, v.142, n.4, Oct, p.435-42. 2007.

Sedaghat, A. R., Z. Zhang, *et al.* Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. Laryngoscope, v.119, n.8, Aug, p.1542-9. 2009.

Severino, P., A. M. Alvares, *et al.* Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites. BMC Res Notes, v.1, p.113. 2008.

Shaw, J. L. e E. P. Diamandis. Regulation of human tissue kallikrein-related peptidase expression by steroid hormones in 32 cell lines. Biol Chem, v.389, n.11, Nov, p.1409-19. 2008.

Sher, Y. P., C. C. Chou, *et al.* Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. Cancer Res, v.66, n.24, Dec 15, p.11763-70. 2006.

Shigemasa, K., X. Tian, *et al.* Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. Oncol Rep, v.11, n.6, Jun, p.1153-9. 2004.

Shimizu-Okabe, C., G. M. Yousef, *et al.* Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. Neuroreport, v.12, n.12, Aug 28, p.2747-51. 2001.

Silveira, N. J., L. Varuzza, *et al.* Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. BMC Med Genomics, v.1, p.56. 2008.

Slaughter, D. P., H. W. Southwick, *et al.* Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer, v.6, n.5, Sep, p.963-8. 1953.

Smith, E. M., J. M. Ritchie, *et al.* Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. Int J Cancer, v.108, n.5, Feb 20, p.766-72. 2004.

Smith, E. M., L. M. Rubenstein, *et al.* Does pretreatment seropositivity to human papillomavirus have prognostic significance for head and neck cancers? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.17, n.8, Aug, p.2087-96. 2008.

Smith Fjd, K. R., Schwartz Me, Mclean Whi, Leachman Sa. Pachyonychia congenita. GeneReviews. 2006.

Stathopoulou, A., I. Vlachonikolis, *et al.* Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. J Clin Oncol, v.20, n.16, Aug 15, p.3404-12. 2002.

Steeg, P. S. e D. Theodorescu. Metastasis: a therapeutic target for cancer. Nat Clin Pract Oncol, v.5, n.4, Apr, p.206-19. 2008.

Stubbs, M. T., M. Renatus, *et al.* An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator. Biol Chem, v.379, n.2, Feb, p.95-103. 1998.

Sturgis, E. M. e Q. Wei. Genetic susceptibility--molecular epidemiology of head and neck

cancer. Curr Opin Oncol, v.14, n.3, May, p.310-7. 2002.

Suarez, C., J. P. Rodrigo, *et al.* Tumours of familial origin in the head and neck. Oral Oncol, v.42, n.10, Nov, p.965-78. 2006.

Sun, T. T. e H. Green. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. Cell, v.9, n.4 Pt 1, Dec, p.511-21. 1976.

Syrjanen, K., S. Syrjanen, *et al.* Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. Int J Oral Surg, v.12, n.6, Dec, p.418-24. 1983.

Takahashi, K., R. D. Paladini, *et al.* Cloning and characterization of multiple human genes and cDNAs encoding highly related type II keratin 6 isoforms. J Biol Chem, v.270, n.31, Aug 4, p.18581-92. 1995.

Tani, N., K. Matsumoto, *et al.* Effects of fibronectin cleaved by neuropsin on cell adhesion and migration. Neurosci Res, v.39, n.2, Feb, p.247-51. 2001.

Tao, L., M. Lefevre, *et al.* Detection of occult carcinomatous diffusion in lymph nodes from head and neck squamous cell carcinoma using real-time RT-PCR detection of cytokeratin 19 mRNA. Br J Cancer, v.94, n.8, Apr 24, p.1164-9. 2006.

Tischkowitz, M., J. S. Brunet, *et al.* Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. BMC Cancer, v.7, p.134. 2007.

Trizna, Z. e S. P. Schantz. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. Otolaryngol Clin North Am, v.25, n.5, Oct, p.1089-103. 1992.

Trost, A., P. Desch, *et al.* Aberrant heterodimerization of keratin 16 with keratin 6A in HaCaT keratinocytes results in diminished cellular migration. Mech Ageing Dev, v.131, n.5, May, p.346-53.

Uehara, N., Y. Matsuoka, *et al.* Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells. Mol Cancer Res, v.6, n.2, Feb, p.186-93. 2008.

Underwood, L. J., H. Tanimoto, *et al.* Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. Cancer Res, v.59, n.17, Sep 1, p.4435-9. 1999.

Van Der Velden, L. A., J. J. Manni, *et al.* Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa. Eur Arch Otorhinolaryngol, v.256, n.10, p.514-9. 1999.

Vincent-Salomon, A., F. C. Bidard, *et al.* Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. J Clin Pathol, v.61, n.5, May, p.570-6. 2008.

Vineis, P., M. Alavanja, *et al.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. J Natl Cancer Inst, v.96, n.2, Jan 21, p.99-106. 2004.

Vora, H. H., N. G. Shah, *et al.* Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. J Surg Oncol, v.82, n.1, Jan, p.34-50. 2003.

- Windoffer, R., A. Kolsch, *et al.* Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. J Cell Biol, v.173, n.3, May 8, p.341-8. 2006.
- Wojcik, S. M., M. A. Longley, *et al.* Discovery of a novel murine keratin 6 (K6) isoform explains the absence of hair and nail defects in mice deficient for K6a and K6b. J Cell Biol, v.154, n.3, Aug 6, p.619-30. 2001.
- Wöll, S., R. Windoffer, *et al.* Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. Eur J Cell Biol, v.84, n.2-3, Mar, p.311-28. 2005.
- Wong, P., E. Colucci-Guyon, *et al.* Introducing a null mutation in the mouse K6alpha and K6beta genes reveals their essential structural role in the oral mucosa. J Cell Biol, v.150, n.4, Aug 21, p.921-8. 2000.
- Wong, P. e P. A. Coulombe. Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair. J Cell Biol, v.163, n.2, Oct 27, p.327-37. 2003.
- Worsham, M. J., S. R. Wolman, *et al.* Common clonal origin of synchronous primary head and neck squamous cell carcinomas: analysis by tumor karyotypes and fluorescence in situ hybridization. Hum Pathol, v.26, n.3, Mar, p.251-61. 1995.
- Xenidis, N., M. Perraki, *et al.* Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. J Clin Oncol, v.24, n.23, Aug 10, p.3756-62. 2006.
- Xu, Y., M. Lefevre, *et al.* Clinical significance of micrometastases detection in lymph nodes from head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg, v.139, n.3, Sep, p.436-41. 2008.
- Yoshida, S., M. Taniguchi, *et al.* Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. Gene, v.213, n.1-2, Jun 15, p.9-16. 1998.
- Yousef, G. M., C. A. Borgono, *et al.* In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. Anticancer Res, v.24, n.1, Jan-Feb, p.43-51. 2004.
- Yousef, G. M. e E. P. Diamandis. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. Endocr Rev, v.22, n.2, Apr, p.184-204. 2001.
- Yousef, G. M., G. M. Yacoub, *et al.* Kallikrein gene downregulation in breast cancer. Br J Cancer, v.90, n.1, Jan 12, p.167-72. 2004.
- Zhang, D. H., L. K. Tai, *et al.* Proteomics of breast cancer: enhanced expression of cytokeratin19 in human epidermal growth factor receptor type 2 positive breast tumors. Proteomics, v.5, n.7, May, p.1797-805. 2005.
- Zhang, Z. F., H. Morgenstern, *et al.* Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.8, n.12, Dec, p.1071-8. 1999.

Anexo 1

Tabela 1. Valores médios de Cts dos padrões internos obtidos de triplicatas de pools de amostras de margens cirúrgicas e de amostras individuais de tumores primários, distribuídos por sítios anatômicos.

Genes de Referência				
Pools de Margem Cirúrgica				
	<i>GAPDH</i>	<i>B-actina</i>	<i>HPRT1</i>	<i>BCR</i>
Língua N0	22,31	22,5318	31,75487	28,9181
Língua N+	22,8399	22,5679	32,35373	30,10287
Laringe N0	23,5892	24,1489	33,0073	29,3093
Laringe N+	23,1691	23,94345	32,51197	28,58153
Língua				
Amostras	<i>GAPDH</i>	<i>B-actina</i>	<i>HPRT1</i>	<i>BCR</i>
CP1/0021 T	22,74347	22,1319	30,2062	25,98607
CP1/0021 M	22,00467	22,28807	30,91615	27,69877
CP1/0057 T	19,38033	18,56217	28,2887	26,72127
CP1/0057 M	19,1326	19,3835	29,73075	26,29843
CP1/0151 T	25,52553	25,493	33,8129	29,1591
CP1/0151 M	24,88907	23,32613	32,7402	27,72693
CP1/0200 T	23,80123	22,95957	27,7259	26,3063
CP1/0200 M	25,27007	27,41553	33,81575	30,5194
CP1/0262 T	23,63657	27,26953	32,93385	29,5928
CP1/0262 M	20,45557	20,441	26,35053	24,78877
CP2/1002 T	21,6187	25,7048	31,70837	29,92027
CP2/1002 M	22,9256	23,12083	29,25303	26,5365
CP3/0049 T	25,49923	25,95905	32,86697	28,34027
CP3/0049 M	33,3056	34,0435	N/A	36,7351
CP3/0050 T	24,46467	25,5173	33,15885	27,20947
CP3/0050 M	26,3539	28,30647	34,3323	29,8307
CP3/0087 T	24,63283	26,08733	32,65447	28,80863
CP3/0087 M	N/A	N/A	29,71413	25,7263
CP3/0118 T	18,2743	19,2564	27,75207	26,51283
CP3/0118 M	21,19337	21,00943	30,58703	27,65943
Soalho de Boca				
Amostras	<i>GAPDH</i>	<i>B-actina</i>	<i>HPRT1</i>	<i>BCR</i>
CP2/0168 T	24,95405	23,9104	28,20855	25,38993
CP2/0168 M	25,12685	25,55677	29,77883	28,67557
CP1/0089 T	21,78983	21,67723	28,0993	26,04685
CP1/0089 M	27,18683	26,1355	33,09003	30,2544
CP1/0255 T	21,9962	22,24413	28,0562	26,01285
CP1/0255 M	33,44743	32,22473	N/A	35,5094
CP1/0240 T	22,42433	22,2786	28,34435	25,37577
CP1/0240 M	25,72567	25,50783	33,06685	28,34637
CP3/0033 T	21,12103	21,9857	28,4253	25,03107
CP3/0033 M	24,85897	28,92507	33,94517	31,98085
CP3/0120 T	26,83117	27,6223	33,8498	30,20203

CP3/0120 M	25,171	24,2125	32,05815	28,0622
CP1/0080 T	22,56733	F/A	27,5865	24,56877
CP1/0080 M	23,5823	F/A	29,9793	28,7785
CP1/0191 T	22,95	22,3084	27,63323	26,1966
CP1/0191 M	22,9242	23,5004	30,55525	25,8525
CP1/0024 T	20,86217	21,35137	27,46025	25,12255
CP1/0024 M	21,4844	22,63003	27,99283	26,88627
CP1/0075 T	25,1092	23,4792	28,9242	26,4428
CP1/0075 M	25,16465	24,9188	27,97793	26,97097
CP1/0083 T	24,9719	26,38065	33,1619	29,21997
CP1/0083 M	26,40985	27,6316	36,3211	30,32493
CP1/0384 T	18,71467	19,7819	27,436	25,308
CP1/0384 M	21,81937	23,49303	31,704	28,94383
CP1/0366 T	19,8604	20,68913	28,827	27,68017
CP1/0366 M	20,88803	20,26163	29,26347	27,23033
CP1/0370 T	21,53627	21,81237	30,89313	28,82337
CP1/0370 M	21,2413	25,0032	33,23685	30,6621
CP2/0051 T	22,3635	22,1888	27,7329	25,64937
CP2/0051 M	24,1701	24,34137	30,86743	28,35927
CP2/0122 T	19,22655	19,1161	27,2361	24,3988
CP2/0122 M	22,14283	24,37543	31,78693	29,45073
CP1/0258 T	25,27837	24,65663	31,6325	26,8638
CP1/0258 M	29,5746	30,18147	36,60733	33,12183
CP3/0280 T	19,01147	21,0191	28,43417	26,5003
CP3/0280 M	22,19433	22,32943	30,883	28,90483
CP1/0032 T	20,20197	19,71567	28,0564	24,9807
CP1/0032 M	23,8245	23,68467	30,8055	27,68993
CP1/0213 T	20,22103	19,67073	27,40387	25,42317
CP1/0213 M	20,71407	19,22877	26,24657	25,2202
CP1/0233 T	20,1105	21,00353	27,27707	25,0098
CP1/0233 M	23,33703	25,12667	32,05397	27,33057
CP1/0055 T	34,2565	24,3873	36,2	35,54195
CP1/0055 M	28,5615	28,6144	37,11843	32,166
CP1/0363 T	18,10227	19,03747	28,01603	24,8956
CP1/0363 M	21,38343	23,07787	31,79367	29,1204
CP1/0228 T	18,73853	18,85983	27,18307	25,43383
CP1/0228 M	20,61723	21,0478	30,3154	27,5631
Laringe				
	<i>GAPDH</i>	<i>B-actina</i>	<i>HPRT1</i>	<i>BCR</i>
CP1/0056 T	26,24163	25,25233	31,80195	31,1849
CP1/0056 M	26,35547	26,27375	34,20343	31,4337
CP1/0357 T	22,75293	25,2537	31,4019	28,67267
CP1/0357 M	21,78193	22,6017	28,9993	26,0443
CP1/0359 T	18,75187	18,37697	23,83497	23,59817
CP1/0359 M	21,37317	22,64973	29,18977	25,7567
CP1/0385 T	20,07777	20,9167	26,53307	24,0986

CP1/0385 M	22,47417	24,57693	30,78513	26,81143
CP3/0035 T	25,66513	26,29237	33,00237	31,29257
CP3/0035 M	21,2552	22,29523	28,23937	25,08337
CP1/0348 T	25,3129	25,1589	33,28257	31,107
CP1/0348 M	27,04703	27,05763	34,8922	32,865
CP3/0019 T	26,28637	26,87775	34,17377	31,273
CP3/0019 M	32,9894	32,5996	N/A	33,7703
CP3/0096 T	31,64805	32,36165	N/A	36,69205
CP3/0096 M	33,51757	33,85043	N/A	36,16645
CP3/0199 T	30,0314	29,4649	37,89145	34,7163
CP3/0199 M	28,3581	27,5325	35,38545	33,44815
CP3/0249 T	26,0326	25,57187	31,4707	30,46955
CP3/0249 M	31,94797	31,3752	N/A	34,56745
CP4/0016 T	19,20867	21,12633	27,25525	23,9645
CP4/0016 M	21,1281	24,35223	31,39415	26,30125
CP3/0377 T	18,71903	20,07903	27,87895	26,29815
CP3/0377 M	19,1972	25,0271	32,23565	29,36
CP4/0024 T	20,31837	21,35137	28,72645	25,9249
CP4/0024 M	20,76373	22,63003	30,38695	26,9413
CP3/0390 T	20,03163	20,95287	25,952	24,81075
CP3/0390 M	25,81037	27,6056	33,9751	28,8787
CP3/0433 T	18,5484	19,84037	26,7727	25,0825
CP3/0433 M	23,18563	25,3469	31,98875	27,58865
CP2/0096 T	20,61253	20,39857	27,47873	24,33083
CP2/0096 M	24,20477	24,20747	31,4189	26,5818
CP3/0018 T	23,8894	24,40143	33,6928	29,4177
CP3/0018 M	21,24847	21,99267	31,6841	27,4792
CP3/0031 T	21,22193	20,7227	30,2082	26,26887
CP3/0031 M	19,75697	20,0679	29,30863	25,31987
CP3/0102 T	19,50703	20,58493	26,75513	25,8197
CP3/0102 M	21,4772	22,5008	29,82863	26,3128
CP3/0105 T	23,07267	23,27827	31,059	28,06023
CP3/0105 M	29,35597	32,921	N/A	34,02975
CP3/0125 T	29,24187	31,5084	N/A	32,97313
CP3/0125 M	26,5627	31,9394	N/A	32,3477
CP3/0136 T	20,3875	20,9208	27,79805	24,2215
CP3/0136 M	34,2568	35,42555	N/A	37,63517
CP3/0153 T	20,02847	20,5384	29,73755	25,37757
CP3/0153 M	21,57087	23,40293	31,23957	25,7352
CP4/0001 T	19,2399	19,34677	27,2692	24,711
CP4/0001 M	25,5842	26,73093	N/A	30,24683
CP3/0085 T	20,79913	22,37303	28,5658	24,92445
CP3/0085 M	21,99337	23,1393	29,0869	25,5986
CP3/0464 T	22,30003	23,7969	28,08305	24,296
CP3/0464 M	23,8508	25,26627	31,141	27,01675
CP3/0076 T	21,0259	24,47843	30,7779	27,7402
CP3/0076 M	24,26223	26,8304	32,7535	28,6607

CP3/0119 T	24,53923	26,12327	30,75955	26,13855
CP3/0119 M	25,3065	27,96987	32,31965	28,01435
CP3/0411 T	20,62263	20,97877	27,3251	25,13705
CP3/0411 M	22,0148	22,8309	29,6862	25,4584

Tabela 2. Valores de quantificação relativa da expressão do gene *KRT6A*, tendo como padrão interno o gene *GAPDH*.

Gene <i>KRT6A</i>					
LÍNGUA					
Amostras	média Ct <i>KRT6A</i>	$(E_{KRT6A})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0021 T	18,78856667	11,89616036	0,601460827	19,7787783	2,7167087
CP1/0021 M	22,31043333				
CP1/0057 T	19,92106667	0,938879772	0,843265109	1,113386243	0,09776519
CP1/0057 M	19,83136667				
CP1/0151 T	23,18436667	0,175141957	0,645342071	0,271393986	-1,1871192
CP1/0151 M	20,70653333				
CP1/0200 T	22,07176667	1,781371684	2,747674988	0,648319649	-0,3944717
CP1/0200 M	22,89296667				
CP1/0262 T	22,0171	0,210558075	0,112033619	1,879418669	0,57432683
CP1/0262 M	19,8012				
CP2/1002 T	29,26526667	0,006970968	2,457938915	0,002836103	-5,3388483
CP2/1002 M	22,20223333				
CP3/0049 T	21,54826667	153,7786248	215,2567079	0,714396435	-0,3061291
CP3/0049 M	28,71016667				
CP3/0050 T	15,66936667	220,6190495	3,669468752	60,12288547	3,72869537
CP3/0050 M	23,3446				
CP3/0087 T	23,1082	0,054522803	-	-	-
CP3/0087 M	18,9706				
CP3/0118 T	19,77156667	0,301328374	7,45370248	0,040426671	-2,9202892
CP3/0118 M	18,06546667				
SOALHO DE BOCA					
Amostras	média Ct <i>KRT6A</i>	$(E_{KRT6A})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP2/0168 T	21,65066667	2,213023253	1,126268173	1,964916799	0,614821
CP2/0168 M	22,78046667				
CP1/0089 T	19,76466667	26,67115278	41,01191545	0,650326923	-0,3916578
CP1/0089 M	24,43483333				
CP1/0255 T	20,6314	1637,723108	2643,846948	0,619447018	-0,4359391
CP1/0255 M	31,15776667				
CP1/0240 T	22,63793333	5,641153748	9,696469214	0,581774007	-0,4930522
CP1/0240 M	25,0986				
CP3/0033 T	18,70256667	101,6923532	13,09461928	7,765964863	1,8657635
CP3/0033 M	25,27626667				
CP3/0120 T	23,28823333	0,428770238	0,319046573	1,343911122	0,26905225
CP3/0120 M	22,0838				
CP1/0080 T	17,94366667	1,049832798	2,010601077	0,522148729	-0,591476
CP1/0080 M	18,01283333				
CP1/0191 T	19,9497	0,231289898	0,982402798	0,235432858	-1,3165059
CP1/0191 M	17,86736667				
CP1/0024 T	17,4335	8,685252094	1,534462735	5,660125786	1,57785065
CP1/0024 M	20,50793333				
CP1/0075 T	21,11923333	0,858114743	1,038894395	0,825988423	-0,1740145

CP1/0075 M	20,9016				
CP1/0083 T	21,95566667	1,223274382	2,689897809	0,454766117	-0,717243
CP1/0083 M	22,2423				
CP1/0384 T	19,62996667	11,97644721	8,469331779	1,414095884	0,31538913
CP1/0384 M	23,1614				
CP1/0366 T	19,22756667	8,786803302	2,028202824	4,332309963	1,33450253
CP1/0366 M	22,31853333				
CP1/0370 T	20,64133333	12,02538647	0,816297195	14,73162782	2,44854055
CP1/0370 M	24,17856667				
CP2/0051 T	18,7702	6,401928599	3,466633806	1,846727678	0,55835462
CP2/0051 M	21,4108				
CP2/0122 T	21,30286667	57,48259617	7,439440006	7,726736974	1,86115399
CP2/0122 M	27,0652				
CP1/0258 T	22,45376667	55,04999265	19,22837346	2,862956285	0,95743946
CP1/0258 M	28,1546				
CP3/0280 T	23,2411	1,086173349	8,937365007	0,121531721	-1,918402
CP3/0280 M	23,35866667				
CP1/0032 T	19,8925	2,501078333	12,09498213	0,206786443	-1,4345995
CP1/0032 M	21,19633333				
CP1/0213 T	19,94823333	4,391490595	1,403927007	3,128004928	1,03803263
CP1/0213 M	22,05273333				
CP1/0233 T	30,26316667	0,001855187	9,20999539	0,000201432	-7,7461896
CP1/0233 M	21,31736667				
CP1/0055 T	27,11686667	0,068603559	0,0198624	3,453941	1,12825599
CP1/0055 M	23,306				
CP1/0363 T	19,23833333	28,87459868	9,562836985	3,019459469	1,00588519
CP1/0363 M	24,0214				
CP1/0228 T	18,27023333	5,058457639	3,642967314	1,38855422	0,29879793
CP1/0228 M	20,57583333				
LARINGE					
Amostras	média Ct KRT6A	$(E_{KRT6A})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0056 T	24,5263	0,603173409	1,081482364	0,557728381	-0,5314734
CP1/0056 M	23,80726667				
CP1/0357 T	20,96946667	1,51010502	0,512641384	2,945733735	0,98338417
CP1/0357 M	21,5557				
CP1/0359 T	16,42383333	9,35925498	6,072724363	1,541195421	0,39373159
CP1/0359 M	19,60456667				
CP1/0385 T	16,3089	31,27327309	5,202013948	6,011762637	1,63271248
CP1/0385 M	21,20546667				
CP3/0035 T	25,37906667	0,007991775	0,048092556	0,166174879	-1,6336196
CP3/0035 M	18,5104				
CP1/0348 T	23,34153333	15,52069106	3,298003267	4,70608723	1,40983024
CP1/0348 M	27,24166667				
CP3/0019 T	24,22775	4,506651513	100,7446826	0,044733393	-2,8281451
CP3/0019 M	26,36906667				
CP3/0096 T	30,92935	0,143364425	3,620018644	0,039603228	-2,9390211

CP3/0096 M	28,16676667				
CP3/0199 T	26,31246667	4,685491721	0,316176179	14,81924328	2,4539381
CP3/0199 M	28,50913333				
CP3/0249 T	21,82483333	116,6767948	58,59027365	1,991402113	0,62700825
CP3/0249 M	28,59403333				
CP4/0016 T	18,42475	31,70462347	3,746524325	8,462409615	1,9439378
CP4/0016 M	23,3408				
CP3/0377 T	19,2991	91,76809785	1,389637673	66,03742804	3,81410413
CP3/0377 M	25,72675				
CP4/0024 T	22,5073	0,316585458	1,358623738	0,233019231	-1,3258857
CP4/0024 M	20,87145				
CP3/0390 T	19,9221	20,90414689	53,33253591	0,391958615	-0,8525292
CP3/0390 M	24,24575				
CP3/0433 T	19,28545	315,4972714	24,31372205	12,97609929	2,33304249
CP3/0433 M	27,46945				
CP2/0096 T	17,30843333	287,2376587	11,84540688	24,24886386	2,90217923
CP2/0096 M	25,35896667				
CP3/0018 T	21,11096667	5,090568429	0,162460935	31,33410764	3,13550762
CP3/0018 M	23,42556667				
CP3/0031 T	19,5983	1,607620083	0,364913731	4,40547984	1,34974749
CP3/0031 M	20,27353333				
CP3/0102 T	17,29516667	5,213237526	3,87963054	1,343745873	0,26894032
CP3/0102 M	19,64363333				
CP3/0105 T	20,1625	126,6095074	75,47159615	1,67757824	0,47091338
CP3/0105 M	27,0479				
CP3/0125 T	23,1459	0,99819701	0,158242378	6,308025864	1,67649933
CP3/0125 M	23,14333333				
CP3/0136 T	16,6846	2385,632044	13959,92139	0,17089151	-1,6081436
CP3/0136 M	27,74596667				
CP3/0153 T	18,61526667	2,846038018	2,890353656	0,984667746	-0,0140641
CP3/0153 M	20,10286667				
CP4/0001 T	18,2558	13,93251248	78,7070387	0,177017364	-1,576086
CP4/0001 M	22,0024				
CP3/0085 T	21,8453	1,053110301	2,274575231	0,462992073	-0,7009255
CP3/0085 M	21,9189				
CP3/0464 T	22,2703	1,704427288	2,907042554	0,586309714	-0,4859832
CP3/0464 M	23,0287				
CP3/0076 T	20,72335	2094,266902	9,272314911	225,8623572	4,93342905
CP3/0076 M	31,59945				
CP3/0119 T	21,76195	4,445545615	1,695508627	2,621953994	0,87739765
CP3/0119 M	23,88385				
CP3/0411 T	20,4754	2,15748371	2,606473364	0,827740555	-0,1720857
CP3/0411 M	21,56905				

Tabela 3. Valores de quantificação relativa da expressão do gene *KRT19*, tendo como referência o gene *GAPDH*.

Gene <i>KRT19</i>					
LÍNGUA					
Amostras	média Ct <i>KRT19</i>	$(E_{KRT19})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0021 T	22,8538	1,065721947	0,601460827	1,771889206	0,520699
CP1/0021 M	22,9463				
CP1/0057 T	22,27703333	2,019568062	0,843265109	2,394938485	0,7949643
CP1/0057 M	23,29846667				
CP1/0151 T	28,9392	0,050754909	0,645342071	0,078648071	-2,314531
CP1/0151 M	24,60756667				
CP1/0200 T	22,76473333	4,576306541	2,747674988	1,665519598	0,46434684
CP1/0200 M	24,9749				
CP1/0262 T	22,38596667	0,978175493	0,112033619	8,731088977	1,97238837
CP1/0262 M	22,3539				
CP2/1002 T	31,18893333	0,008176005	2,457938915	0,003326366	-5,1937111
CP2/1002 M	24,20403333				
CP3/0049 T	27,06073333	38,08495637	215,2567079	0,176928082	-1,5765452
CP3/0049 M	32,35013333				
CP3/0050 T	27,26383333	2,737107049	3,669468752	0,74591371	-0,2668324
CP3/0050 M	28,72706667				
CP3/0087 T	29,30986667	0,073863975	-	-	-
CP3/0087 M	25,5235				
CP3/0118 T	23,71126667	7,891090276	7,45370248	1,058680608	0,05190496
CP3/0118 M	26,7132				
SOALHO DE BOCA					
Amostras	média Ct <i>KRT19</i>	$(E_{KRT19})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP2/0168 T	22,2151	13,43939011	1,126268173	11,93267326	2,25673817
CP2/0168 M	25,9908				
CP1/0089 T	21,59445	23,18120185	41,01191545	0,565230899	-0,5193106
CP1/0089 M	26,16236667				
CP1/0255 T	26,99063333	16,92913647	2643,846948	0,006403221	-4,5975766
CP1/0255 M	31,1018				
CP1/0240 T	19,77796667	11,97325111	9,696469214	1,234805252	0,19198153
CP1/0240 M	23,3858				
CP3/0033 T	19,5516	217,4302418	13,09461928	16,60454857	2,55747792
CP3/0033 M	27,37256667				
CP3/0120 T	24,9576	2,978932574	0,319046573	9,33698345	2,03345917
CP3/0120 M	26,54386667				
CP1/0080 T	27,2641	0,252298867	2,010601077	0,125484299	-1,8892695
CP1/0080 M	25,26283333				
CP1/0191 T	20,37713333	3,052390353	0,982402798	3,107066022	1,03191899
CP1/0191 M	21,9988				
CP1/0024 T	17,8418	144,1732666	1,534462735	93,95683801	4,13506708
CP1/0024 M	25,0657				
CP1/0075 T	21,42666667	3,326265105	1,038894395	3,201735539	1,05923903

CP1/0075 M	23,1732				
CP1/0083 T	29,05123333	1,96879696	2,689897809	0,731922586	-0,2840679
CP1/0083 M	30,03566667				
CP1/0384 T	26,95543333	0,295367438	8,469331779	0,03487494	-3,0547508
CP1/0384 M	25,1832				
CP1/0366 T	33,08255	0,000790732	2,028202824	0,000389869	-7,1451057
CP1/0366 M	22,70296667				
CP1/0370 T	32,99876667	0,050772375	0,816297195	0,062198395	-2,5281222
CP1/0370 M	28,66763333				
CP2/0051 T	23,6884	5,839274688	3,466633806	1,684422127	0,47461926
CP2/0051 M	26,25273333				
CP2/0122 T	24,24233333	2,42034222	7,439440006	0,325339302	-1,0220955
CP2/0122 M	25,52683333				
CP1/0258 T	22,4993	109,8570194	19,22837346	5,713276768	1,5863583
CP1/0258 M	29,32816667				
CP3/0280 T	22,42733333	1,53851576	8,937365007	0,172144224	-1,6014955
CP3/0280 M	23,0534				
CP1/0032 T	21,26256667	7,865429462	12,09498213	0,650305174	-0,3916883
CP1/0032 M	24,25976667				
CP1/0213 T	30,1246	0,002925191	1,403927007	0,002083578	-5,6195154
CP1/0213 M	21,64603333				
CP1/0233 T	26,98806667	0,139627636	9,20999539	0,015160446	-3,8130517
CP1/0233 M	24,12703333				
CP1/0055 T	34,16105	0,088054141	0,0198624	4,43320748	1,35545849
CP1/0055 M	30,63005				
CP1/0363 T	21,80326667	22,91186423	9,562836985	2,395927513	0,79534012
CP1/0363 M	26,3542				
CP1/0228 T	31,23423333	0,014135418	3,642967314	0,003880193	-5,0535301
CP1/0228 M	25,04493333				
LARINGE					
Amostras	média Ct KRT19	$(E_{KRT19})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0056 T	34,88455	0,020780282	1,081482364	0,019214629	-3,5973413
CP1/0056 M	29,2552				
CP1/0357 T	25,0348	0,115573036	0,512641384	0,225446169	-1,3559596
CP1/0357 M	21,899				
CP1/0359 T	27,54033333	0,009458197	6,072724363	0,001557488	-5,8844061
CP1/0359 M	20,76713333				
CP1/0385 T	21,20906667	1,497706642	5,202013948	0,287909002	-1,1333487
CP1/0385 M	21,79606667				
CP3/0035 T	28,31393333	0,006938486	0,048092556	0,144273588	-1,7622631
CP3/0035 M	21,09053333				
CP1/0348 T	29,3785	0,742329326	3,298003267	0,225084473	-1,3574211
CP1/0348 M	28,9455				
CP3/0019 T	30,4313	74,01606508	100,7446826	0,734689546	-0,2806334
CP3/0019 M	36,6863				
CP3/0096 T	32,52195	3,167040493	3,620018644	0,874868559	-0,1216823

CP3/0096 M	34,1972				
CP3/0199 T	32,5638	0,192092191	0,316176179	0,607547956	-0,4535942
CP3/0199 M	30,16633333				
CP3/0249 T	28,49143333	11,64871155	58,59027365	0,198816473	-1,470376
CP3/0249 M	32,05933333				
CP4/0016 T	21,28745	4,779173678	3,746524325	1,275628626	0,22158782
CP4/0016 M	23,56065				
CP3/0377 T	23,40785	61,26973409	1,389637673	44,0904383	3,44638685
CP3/0377 M	29,3882				
CP4/0024 T	24,0689	13,47040702	1,358623738	9,914744338	2,0881097
CP4/0024 M	27,84795				
CP3/0390 T	26,4082	2,48823085	53,33253591	0,046655026	-2,7898601
CP3/0390 M	27,7329				
CP3/0433 T	24,3185	1,20119761	24,31372205	0,049404102	-2,7377464
CP3/0433 M	24,5849				
CP2/0096 T	21,2896	353,6220532	11,84540688	29,8530947	3,09143503
CP2/0096 M	29,81733333				
CP3/0018 T	36,76825	4,7663E-05	0,162460935	0,000293381	-7,4039206
CP3/0018 M	22,3069				
CP3/0031 T	32,2597	0,000536219	0,364913731	0,00146944	-5,9373759
CP3/0031 M	21,31566667				
CP3/0102 T	26,0504	0,014914176	3,87963054	0,003844226	-5,0620069
CP3/0102 M	19,93903333				
CP3/0105 T	25,78836667	5,868412176	75,47159615	0,077756566	-2,3249078
CP3/0105 M	28,35993333				
CP3/0125 T	32,2555	0,032037962	0,158242378	0,20246133	-1,4538399
CP3/0125 M	27,25526667				
CP3/0136 T	23,09716667	1959,096868	13959,92139	0,140337242	-1,787443
CP3/0136 M	34,1128				
CP3/0153 T	26,13603333	0,010943224	2,890353656	0,003786119	-5,0758705
CP3/0153 M	19,57476667				
CP4/0001 T	19,87496667	27,54693965	78,7070387	0,349993344	-0,9556066
CP4/0001 M	24,69363333				
CP3/0085 T	23,25885	1,28867173	2,274575231	0,566554894	-0,5171809
CP3/0085 M	23,6274				
CP3/0464 T	21,3764	18,26640532	2,907042554	6,283501179	1,67295356
CP3/0464 M	25,59805				
CP3/0076 T	22,99925	10,4749008	9,272314911	1,129696403	0,1110027
CP3/0076 M	26,4128				
CP3/0119 T	26,30845	1,95182269	1,695508627	1,151172373	0,12814428
CP3/0119 M	27,2803				
CP3/0411 T	26,43485	0,154287232	2,606473364	0,059193865	-2,5731893
CP3/0411 M	23,7189				

Tabela 4. Valores de quantificação relativa da expressão do gene *MSLN*, tendo como referência o gene *GAPDH*.

Gene <i>MSLN</i>					
LÍNGUA					
Amostras	Média Ct <i>MSLN</i>	$(E_{MSLN})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0021 T	29,64463333	0,543352805	0,601460827	0,903388518	-0,0924826
CP1/0021 M	28,7831				
CP1/0057 T	27,65476667	0,185198168	0,843265109	0,219620338	-1,3797906
CP1/0057 M	25,27306667				
CP1/0151 T	35,71375	0,019186168	0,645342071	0,02973023	-3,2000287
CP1/0151 M	30,1299				
CP1/0200 T	25,97203333	561,2919669	2,747674988	204,2788792	4,84200493
CP1/0200 M	34,9126				
CP1/0262 T	31,3887	1,064841941	0,112033619	9,504664346	2,04966091
CP1/0262 M	31,47743333				
CP2/1002 T	34,9552	0,28720499	2,457938915	0,116847896	-1,9541764
CP2/1002 M	33,1932				
CP3/0049 T	30,90035	11,55698848	215,2567079	0,05368933	-2,6620319
CP3/0049 M	34,3568				
CP3/0050 T	25,3378	875,6016845	3,669468752	238,6181062	4,98343633
CP3/0050 M	34,9064				
CP3/0087 T	34,06575	0,653308046	-	-	-
CP3/0087 M	33,4645				
CP3/0118 T	31,87153333	1,297989832	7,45370248	0,174140279	-1,5910018
CP3/0118 M	32,2399				
SOALHO DE BOCA					
Amostras	Média Ct <i>MSLN</i>	$(E_{MSLN})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP2/0168 T	33,70125	0,124320298	1,126268173	0,110382501	-2,0059885
CP2/0168 M	30,75663333				
CP1/0089 T	29,5653	6,068762751	41,01191545	0,147975599	-1,7392013
CP1/0089 M	32,112				
CP1/0255 T	30,82245	-	2643,846948	-	-
CP1/0255 M	N/A				
CP1/0240 T	26,4413	16,94698375	9,696469214	1,747747905	0,50821209
CP1/0240 M	30,4384				
CP3/0033 T	23,99063333	1308,997187	13,09461928	99,96450899	4,19148344
CP3/0033 M	34,12715				
CP3/0120 T	25,3974	156,0289696	0,319046573	489,0476273	5,63661989
CP3/0120 M	32,52986667				
CP1/0080 T	24,11393333	1027,932721	2,010601077	511,2564264	5,67704489
CP1/0080 M	33,90906667				
CP1/0191 T	22,67403333	1582,178223	0,982402798	1610,518849	6,72149015
CP1/0191 M	33,07825				
CP1/0024 T	23,23996667	373,4963449	1,534462735	243,4052886	5,00151688
CP1/0024 M	31,60523333				
CP1/0075 T	30,12506667	3,237713571	1,038894395	3,11649922	1,03467833

CP1/0075 M	31,7844				
CP1/0083 T	32,215	0,5007695	2,689897809	0,186166738	-1,5302146
CP1/0083 M	31,2382				
CP1/0384 T	32,29925	2,656430194	8,469331779	0,313652867	-1,0553936
CP1/0384 M	33,6791				
CP1/0366 T	30,5028	0,019725441	2,028202824	0,009725576	-4,2171348
CP1/0366 M	24,9581				
CP1/0370 T	31,16423333	-	0,816297195	-	-
CP1/0370 M	N/A				
CP2/0051 T	30,08263333	1,090169473	3,466633806	0,314474944	-1,053011
CP2/0051 M	30,20456667				
CP2/0122 T	31,09825	19,72860773	7,439440006	2,65189419	0,88773281
CP2/0122 M	35,31				
CP1/0258 T	26,292	117,1082109	19,22837346	6,090385707	1,6445396
CP1/0258 M	33,0192				
CP3/0280 T	34,04275	1,436378344	8,937365007	0,160716088	-1,6640228
CP3/0280 M	34,5542				
CP1/0032 T	26,84713333	13,35804785	12,09498213	1,104428903	0,09041258
CP1/0032 M	30,50813333				
CP1/0213 T	32,7947	0,007815471	1,403927007	0,005566864	-4,7249821
CP1/0213 M	25,94243333				
CP1/0233 T	22,93743333	88,33486997	9,20999539	9,591195894	2,05791034
CP1/0233 M	29,2664				
CP1/0055 T	32,3971	3,286252786	0,0198624	165,4509394	4,65011612
CP1/0055 M	34,07745				
CP1/0363 T	25,0831	76,0755998	9,562836985	7,955337932	1,88769338
CP1/0363 M	31,20105				
CP1/0228 T	31,50253333	0,346963007	3,642967314	0,095241867	-2,140278
CP1/0228 M	30,0075				
LARINGE					
Amostras	Média Ct MSLN	$(E_{MSLN})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0056 T	N/A	-	1,081482364	-	-
CP1/0056 M	33,96036667				
CP1/0357 T	27,34643333	0,436829173	0,512641384	0,852114532	-0,1456695
CP1/0357 M	26,1767				
CP1/0359 T	27,3002	0,551101806	6,072724363	0,090750341	-2,1842492
CP1/0359 M	26,45866667				
CP1/0385 T	23,7951	1,877231036	5,202013948	0,360866206	-0,9277595
CP1/0385 M	24,6846				
CP3/0035 T	30,93366667	0,151060033	0,048092556	3,141027365	1,04181425
CP3/0035 M	28,2642				
CP1/0348 T	33,13385	6,283450747	3,298003267	1,905228782	0,58674211
CP1/0348 M	35,72965				
CP3/0019 T	34,00993333	-	100,7446826	-	-
CP3/0019 M	N/A				
CP3/0096 T	37,3852	0,083473745	3,620018644	0,023058927	-3,4313309

CP3/0096 M	33,878				
CP3/0199 T	N/A	-	0,316176179	-	-
CP3/0199 M	35,876				
CP3/0249 T	30,43875	5,565755753	58,59027365	0,094994534	-2,1426448
CP3/0249 M	32,86325				
CP4/0016 T	25,8388	0,168059708	3,746524325	0,044857498	-2,8256233
CP4/0016 M	23,31995				
CP3/0377 T	26,0326	7,790848549	1,389637673	5,606388413	1,56916753
CP3/0377 M	28,9321				
CP4/0024 T	26,483	1,249771171	1,358623738	0,91988027	-0,0760157
CP4/0024 M	26,7979				
CP3/0390 T	26,2665	115,5310704	53,33253591	2,166239959	0,70360848
CP3/0390 M	32,97455				
CP3/0433 T	29,30835	0,014878749	24,31372205	0,000611949	-6,7347346
CP3/0433 M	23,3654				
CP2/0096 T	23,98346667	94,29828808	11,84540688	7,96074707	1,88831207
CP2/0096 M	30,4047				
CP3/0018 T	36,08805	0,000362167	0,162460935	0,002229258	-5,5579996
CP3/0018 M	24,89736667				
CP3/0031 T	28,19346667	0,330006659	0,364913731	0,904341579	-0,0915229
CP3/0031 M	26,62766667				
CP3/0102 T	24,18186667	0,990346804	3,87963054	0,255268329	-1,2428771
CP3/0102 M	24,16816667				
CP3/0105 T	28,9699	11,18783331	75,47159615	0,148238992	-1,7375825
CP3/0105 M	32,3805				
CP3/0125 T	32,4068	0,35676153	0,158242378	2,254525845	0,73996959
CP3/0125 M	30,9511				
CP3/0136 T	28,08856667	285,5443746	13959,92139	0,020454583	-3,5404194
CP3/0136 M	36,0746				
CP3/0153 T	33,2995	0,000722514	2,890353656	0,000249974	-7,5496637
CP3/0153 M	23,08423333				
CP4/0001 T	29,5908	0,222116678	78,7070387	0,002822069	-5,3433637
CP4/0001 M	27,46583333				
CP3/0085 T	31,4336	0,006433693	2,274575231	0,002828525	-5,3412836
CP3/0085 M	24,30655				
CP3/0464 T	29,2978	1,132631284	2,907042554	0,389616341	-0,8579849
CP3/0464 M	29,4737				
CP3/0076 T	25,3137	3,747100643	9,272314911	0,40411706	-0,8247229
CP3/0076 M	27,1794				
CP3/0119 T	27,5862	7,507095999	1,695508627	4,427636569	1,35431394
CP3/0119 M	30,4333				
CP3/0411 T	24,86915	2,089719526	2,606473364	0,801742137	-0,201134
CP3/0411 M	25,9101				

Tabela 5. Valores de quantificação relativa da expressão do gene *KLK8*, tendo como referência o gene *GAPDH*.

Gene <i>KLK8</i>					
LÍNGUA					
Amostras	média Ct <i>KLK8</i>	$(E_{KLK8})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0021 T	26,4023	15,8865432	0,601460827	26,41326331	2,98000151
CP1/0021 M	30,39203333				
CP1/0057 T	27,6336	0,590271258	0,843265109	0,699983021	-0,3246816
CP1/0057 M	26,87305				
CP1/0151 T	33,76876667	0,012412464	0,645342071	0,01923393	-3,5964275
CP1/0151 M	27,4367				
CP1/0200 T	28,3187	3,304808479	2,747674988	1,202765426	0,16805149
CP1/0200 M	30,04326667				
CP1/0262 T	28,20633333	0,103629022	0,112033619	0,924981475	-0,0709819
CP1/0262 M	24,93583333				
CP2/1002 T	34,781	0,00443905	2,457938915	0,001806005	-5,7496517
CP2/1002 M	26,96546667				
CP3/0049 T	30,29666667	64,33729312	215,2567079	0,298886356	-1,0992885
CP3/0049 M	36,30425				
CP3/0050 T	31,27876667	0,048826223	3,669468752	0,013306074	-3,9318099
CP3/0050 M	26,92256667				
CP3/0087 T	32,30406667	0,013478465	-	-	-
CP3/0087 M	26,09086667				
CP3/0118 T	26,6656	0,554003374	7,45370248	0,074325931	-2,3659806
CP3/0118 M	25,81356667				
SOALHO DE BOCA					
Amostras	média Ct <i>KLK8</i>	$(E_{KLK8})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP2/0168 T	25,6993	3,248409096	1,126268173	2,884223469	0,96417609
CP2/0168 M	27,39903333				
CP1/0089 T	26,51813333	16,91072569	41,01191545	0,412336891	-0,8063942
CP1/0089 M	30,598				
CP1/0255 T	24,47493333	3316,203134	2643,846948	1,254309799	0,20624697
CP1/0255 M	36,17025				
CP1/0240 T	26,75703333	103,9803183	9,696469214	10,72352379	2,15948778
CP1/0240 M	33,4572				
CP3/0033 T	26,0059	39,93273553	13,09461928	3,049553002	1,01491221
CP3/0033 M	31,3254				
CP3/0120 T	31,56356667	2,113132649	0,319046573	6,623273298	1,72088891
CP3/0120 M	32,64295				
CP1/0080 T	24,44043333	2,511588306	2,010601077	1,249172864	0,2025115
CP1/0080 M	25,76903333				
CP1/0191 T	26,3547	1,109800225	0,982402798	1,129679422	0,11098901
CP1/0191 M	26,505				
CP1/0024 T	26,5269	8,355927645	1,534462735	5,445507052	1,54266513
CP1/0024 M	29,5897				
CP1/0075 T	28,6509	0,364578149	1,038894395	0,350928978	-0,9531765

CP1/0075 M	27,1952				
CP1/0083 T	28,6321	3,917138122	2,689897809	1,456240497	0,3421208
CP1/0083 M	30,6019				
CP1/0384 T	25,3184	18,31897232	8,469331779	2,162977293	0,7022365
CP1/0384 M	29,51366667				
CP1/0366 T	26,5348	5,127302442	2,028202824	2,528002812	0,84418279
CP1/0366 M	28,893				
CP1/0370 T	25,0799	381,7188621	0,816297195	467,6224105	5,59584234
CP1/0370 M	33,65626667				
CP2/0051 T	24,18666667	7,84750114	3,466633806	2,26372371	0,74367557
CP2/0051 M	27,1589				
CP2/0122 T	24,6387	101,3756017	7,439440006	13,62677857	2,37757842
CP2/0122 M	31,30226667				
CP1/0258 T	27,25266667	54,62539872	19,22837346	2,840874649	0,95039168
CP1/0258 M	33,02416667				
CP3/0280 T	28,6782	0,535478294	8,937365007	0,05991456	-2,5621739
CP3/0280 M	27,7771				
CP1/0032 T	26,02296667	2,952424158	12,09498213	0,244103226	-1,2835867
CP1/0032 M	27,58486667				
CP1/0213 T	23,45013333	57,48047186	1,403927007	40,94263561	3,37896453
CP1/0213 M	29,29513333				
CP1/0233 T	33,5638	0,015504527	9,20999539	0,001683446	-5,8136184
CP1/0233 M	27,55263333				
CP1/0055 T	34,30733333	0,262341266	0,0198624	13,20793371	2,3491615
CP1/0055 M	32,37685				
CP1/0363 T	25,12213333	35,2243212	9,562836985	3,683459339	1,18681755
CP1/0363 M	30,26063333				
CP1/0228 T	24,807	9,429840268	3,642967314	2,588505318	0,86571088
CP1/0228 M	28,04423333				
LARINGE					
Amostras	média Ct KLK8	$(E_{KLK8})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	$(E_{GAPDH})^{\Delta Ct (MC - AT)}$	Expressão Relativa	Log ₃
CP1/0056 T	36,72915	0,021307424	1,081482364	0,019702054	-3,5745389
CP1/0056 M	31,17665				
CP1/0357 T	28,427	0,210717959	0,512641384	0,411043599	-0,8092536
CP1/0357 M	26,18038519				
CP1/0359 T	15,0674	1528,145996	6,072724363	251,6409283	5,03180534
CP1/0359 M	25,64496667				
CP1/0385 T	24,34503333	24,48738253	5,202013948	4,707288903	1,41006263
CP1/0385 M	28,959				
CP3/0035 T	36,11835	0,00103085	0,048092556	0,021434708	-3,4978161
CP3/0035 M	26,1964				
CP1/0348 T	31,50695	2,678174566	3,298003267	0,812059403	-0,1894952
CP1/0348 M	32,9282				
CP3/0019 T	31,30636667	57,51767016	100,7446826	0,570925122	-0,5101866
CP3/0019 M	37,1523				
CP3/0096 T	31,60955	-	3,620018644	-	-

CP3/0096 M	N/A				
CP3/0199 T	34,40625	0,234011283	0,316176179	0,740129392	-0,2739185
CP3/0199 M	32,3109				
CP3/0249 T	32,73895	2,882092555	58,59027365	0,049190631	-2,741688
CP3/0249 M	34,26606667				
CP4/0016 T	26,4029	3,09127071	3,746524325	0,825103601	-0,1749901
CP4/0016 M	28,0311				
CP3/0377 T	27,4933	46,62558754	1,389637673	33,55233413	3,19776728
CP3/0377 M	33,03635				
CP4/0024 T	25,38035	1,921123146	1,358623738	1,414021477	0,31534124
CP4/0024 M	26,3223				
CP3/0390 T	25,81205	15,61055581	53,33253591	0,292702298	-1,1183192
CP3/0390 M	29,7765				
CP3/0433 T	24,9333	67,24709309	24,31372205	2,765808252	0,92601632
CP3/0433 M	31,0047				
CP2/0096 T	24,10673333	562,5873617	11,84540688	47,49413571	3,51407524
CP2/0096 M	33,24266667				
CP3/0018 T	30,89663333	0,483314215	0,162460935	2,974956502	0,99236958
CP3/0018 M	29,84766667				
CP3/0031 T	26,132	22,80692437	0,364913731	62,49949635	3,76398347
CP3/0031 M	30,6434				
CP3/0102 T	27,7922	0,80770479	3,87963054	0,208191162	-1,4284371
CP3/0102 M	27,4841				
CP3/0105 T	26,16066667	70,18544639	75,47159615	0,929958421	-0,0660974
CP3/0105 M	32,29376667				
CP3/0125 T	34,0206	0,495343079	0,158242378	3,130280818	1,03869466
CP3/0125 M	33,0071				
CP3/0136 T	23,18926667	4944,755027	13959,92139	0,354210807	-0,9447037
CP3/0136 M	35,46095				
CP3/0153 T	25,75616667	6,79716589	2,890353656	2,351672736	0,77837003
CP3/0153 M	28,5211				
CP4/0001 T	24,23223333	32,99708479	78,7070387	0,419239313	-0,7912831
CP4/0001 M	29,2765				
CP3/0085 T	26,7048	0,258601043	2,274575231	0,113692016	-1,9790987
CP3/0085 M	24,7536				
CP3/0464 T	28,32465	1,597316275	2,907042554	0,549464359	-0,5450616
CP3/0464 M	29,0003				
CP3/0076 T	31,44245	21,05440208	9,272314911	2,270673751	0,74646588
CP3/0076 M	35,8385				
CP3/0119 T	26,08325	5,060394993	1,695508627	2,984588172	0,9953118
CP3/0119 M	28,4225				
CP3/0411 T	25,5456	5,360063157	2,606473364	2,056442713	0,65626214
CP3/0411 M	27,96785				

Anexo 2

Tabela 1. Sessenta tags mais discriminativas com aumento de expressão em laringe N+ versus laringe N0, segundo Silveira *et al.*, (2008). São apresentadas as frequências absolutas e normalizadas de cada tag nas bibliotecas de tumor e tecido normal, Unigene ID e símbolo do gene de acordo com a base de dados *SAGEmap*. A: biblioteca de laringe N+, NA: biblioteca de laringe N0, N: biblioteca de tecido normal.

	Frequência Absoluta			Frequência Normalizada			Anotação <i>SAGEmap</i>	
Tag	A	NA	N	A	NA	A / NA	Unigene ID	Símbolo do gene
GTCTCTTGGG	72	1	1	72	0,47	151,8	594095	CMIP
ATATTCTTTG	154	7	4	154	3,32	46,4	515947	NBPF10
ATAATCTTTG	15	1	0	15	0,47	31,6	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CCTAGCTGGT	14	1	0	14	0,47	29,5	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CACCTAATGG	67	5	1	67	2,37	28,2	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GACTCTTCAG	24	2	1	24	0,95	25,3	534293	SERPINA3
GACCACCTTT	12	1	2	12	0,47	25,3	389137	MFAP2
GGTGGTGTCT	34	3	19	34	1,42	23,9	2704	GPX2
TGGGTTAATA	11	1	0	11	0,47	23,2	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GCATAAATAG	11	1	2	11	0,47	23,2	381123	RPL21
CCACTACACT	11	1	11	11	0,47	23,2	478275	TNFSF10
GCATTAATAG	10	1	1	10	0,47	21,1	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GCTTTCTCAC	48	5	48	48	2,37	20,2	546269	RPL10A
GATTTTATAA	9	1	0	9	0,47	19,0	659345	
GACATCAAGT	9	1	55	9	0,47	19,0	654568	KRT19
ATGTGAAGAA	8	1	3	8	0,47	16,9	13662	TMEM109
GGCACAATCA	8	1	3	8	0,47	16,9	464416	USP14
CTGGGTAA	8	1	4	8	0,47	16,9	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GGAACTTTTA	8	1	9	8	0,47	16,9	162016	SULF2
TTGGGTCCTC	7	1	0	7	0,47	14,8	484195	LOC153222
TAGGGCATCT	7	1	0	7	0,47	14,8	546298	SUMO2
TGAGGTTCCC	7	1	1	7	0,47	14,8	483444	CXCL14
CCCATCGTGC	7	1	3	7	0,47	14,8	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CAGAAATGAA	7	1	3	7	0,47	14,8	81424	SUMO1
CGGTTTCCAA	7	1	3	7	0,47	14,8	496255	PRKCZ
TTAATTCTTT	7	1	3	7	0,47	14,8	77578	USP9X
AGCGAGAGAG	7	1	4	7	0,47	14,8	449278	BRD9
AAAGAACAGA	7	1	5	7	0,47	14,8	636798	

AAAGTCTAGA	20	3	13	20	1,42	14,1	523852	CCND1
CCCCCTGCAG	18	3	2	18	1,42	12,6	408488	MSLN
GACTCCAAAA	6	1	0	6	0,47	12,6	595011	
CGCCCTTTCC	6	1	0	6	0,47	12,6	483444	CXCL14
GCCACAGTAC	6	1	0	6	0,47	12,6	55044	DKFZP586H2123
TTGGAGACTC	6	1	0	6	0,47	12,6	546271	PCBP2
ACCCTGGGCA	6	1	1	6	0,47	12,6	654792	NADK
CGGCTGCCCA	6	1	1	6	0,47	12,6	349470	SNCG
TTGGGCCTCT	6	1	1	6	0,47	12,6	632703	RPL41
GAGGGAGGTT	6	1	2	6	0,47	12,6	169047	NCAN
GGGAGGGCGC	6	1	4	6	0,47	12,6	483444	CXCL14
GCCCCCTTCC	6	1	4	6	0,47	12,6	212680	TNFRSF18
GCAAGAAAGT	6	1	5	6	0,47	12,6	523443	HBB
TTGTTATTGC	6	1	6	6	0,47	12,6	631827	ANXA7
AGGCTCCTGG	31	6	5	31	2,85	10,9	483444	CXCL14
TAGAAAGGCA	10	2	21	10	0,95	10,5	503093	ZFP36L2
TGTCTGAGGG	5	1	0	5	0,47	10,5	663639	C6orf148
CTGCCGAGCT	5	1	0	5	0,47	10,5	93002	UBE2C
TCCTGCTGGC	5	1	0	5	0,47	10,5	645835	PSAP
CCTTCCAATT	5	1	1	5	0,47	10,5	659997	FHAD1
TAAGGAGTGA	5	1	1	5	0,47	10,5	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CCTAGCTGGG	5	1	1	5	0,47	10,5	356331	PPIA
AGGAAGCTGC	5	1	1	5	0,47	10,5	408018	RPL36
GAAAAATGGC	5	1	1	5	0,47	10,5	654675	CSNK2A1P
CGACGAGGAG	5	1	1	5	0,47	10,5	9999	EMP3
TTGGGGGTTT	5	1	1	5	0,47	10,5	524910	FTH1
CCTGGAATGA	5	1	1	5	0,47	10,5	400876	LOC388796
GCTGTTGCAT	5	1	1	5	0,47	10,5	498548	RBM17
CAATAAAATG	5	1	1	5	0,47	10,5	222510	DAZAP1
CTAAGGCACT	5	1	1	5	0,47	10,5	695299	
CTCGAGCGGC	18	4	1	18	1,90	9,5	476052	SNRK
CCGTGCTCAT	18	4	17	18	1,90	9,5	9857	DCXR
GCATTTTGTG	9	2	4	9	0,95	9,5	368527	TOLLIP

Tabela 2. Sessenta tags mais discriminativas com redução de expressão em laringe N+ versus laringe N0, segundo Silveira *et al.*, (2008). São apresentadas as frequências absolutas e normalizadas de cada tag nas bibliotecas de tumor e tecido normal, Unigene ID e símbolo do gene de acordo com a base de dados *SAGEmap*. A: biblioteca de laringe N+, NA: biblioteca de laringe N0, N: biblioteca de tecido normal.

	Frenquência Absoluta			Frequência Normalizada			Anotação <i>SAGEmap</i>	
Tag	A	NA	N	A	NA	NA / N	Unigene ID	Símbolo do gene
TAAACCAAAT	10	1063	0	10	504,32	50,4	382696	
CTCCCCCAAA	2	133	138	2	63,10	31,5	648398	IGHA1
CTCCCCCAAG	4	221	341	4	104,85	26,2	648398	IGHA1
GTGCCCCGTGC	2	94	63	2	44,60	22,3	524219	TPI1
GTCTGTGCAG	1	42	5	1	19,93	19,9	104570	KLK8
GGAGTGTGCG	1	41	16	1	19,45	19,5	4944	C9orf58
TACATAATTA	2	80	23	2	37,95	19,0	523789	TncRNA
GTGCGCCGGA	1	39	2	1	18,50	18,5	2785	KRT17
TACCTGCAAA	1	39	46	1	18,50	18,5	647047	NCF1
ACTGAGGAAA	1	37	0	1	17,55	17,6	450230	IGFBP3
GCTTTTTTTTG	1	37	63	1	17,55	17,6	654435	AKR1A1
GGCTTCTAAC	6	210	26	6	99,63	16,6	568518	SPRR2E
CCTGGGAAGT	1	35	18	1	16,61	16,6	89603	MUC1
GCCCTATGCG	1	35	156	1	16,61	16,6	441280	LYPD2
AGCTTCCACC	1	32	3	1	15,18	15,2	490252	SPRR2F
GCGGAGGTGG	1	30	66	1	14,23	14,2	648398	IGHA1
CTTCTACTAA	2	55	46	2	26,09	13,0	522401	FAM129B
TCCAGGGGCC	1	27	40	1	12,81	12,8	170835	UCHL5IP
AGTCTGCTGG	1	26	13	1	12,34	12,3	298713	C10orf99
TTTCCTGCTC	28	706	1845	28	334,95	12,0	139322	SPRR3
TGGCTAAAAA	1	23	11	1	10,91	10,9	535762	SNHG8
GGGTTGGCTT	1	22	21	1	10,44	10,4	523084	SFTPA2B
GAATAAATGT	1	21	2	1	9,96	10,0	103934	FKBP9
TAAGGCTTAA	5	103	55	5	48,87	9,8	275464	KLK10
AGAACCTTCC	6	121	27	6	57,41	9,6	181244	HLA-A
TACCTGCAGA	194	3907	3948	194	1853,60	9,6	416073	S100A8
TATTGACAAC	1	20	14	1	9,49	9,5	50382	TJP2
GAAGCACAAG	4	79	24	4	37,48	9,4	433845	KRT6A

GGGTCTGAGG	3	57	218	3	27,04	9,0	657412	
CTTAAATCTG	1	19	4	1	9,01	9,0	445203	DNAJA1
AGTGCAGGGA	2	37	9	2	17,55	8,8	449585	IGL@
TAGAGATTTG	4	72	24	4	34,16	8,5	181300	SEL1L
GTGCTGGTGC	1	18	2	1	8,54	8,5	9613	ANGPTL4
TGCCCCTGAA	1	18	2	1	8,54	8,5	441975	XAF1
TAATTCTTCT	1	18	4	1	8,54	8,5	491494	CCT3
TGGCTTAAAT	1	18	7	1	8,54	8,5	433213	HIG2
TACTGCAGAA	3	54	19	3	25,62	8,5	534221	
CTTGTAATCC	3	52	3	3	24,67	8,2	493709	NOL6
GAAATCCAAA	2	34	0	2	16,13	8,1	500645	ALDH18A1
TGGGTGAAAA	1	17	1	1	8,07	8,1	359698	DDC
TGCCTGCAGA	1	17	20	1	8,07	8,1	661757	
GTGGCTCACA	4	66	14	4	31,31	7,8	433381	C6orf89
TAAATAATTT	2	33	3	2	15,66	7,8	1197	HSPE1
CTGCAGGAAA	1	16	3	1	7,59	7,6	689169	
CTTCTTGCCC	1	16	3	1	7,59	7,6	449630	HBA1
TGAGTGGTAG	1	16	4	1	7,59	7,6	594444	LMNA
TTATGGATCT	1	16	5	1	7,59	7,6	302963	SPON2
CGGCTGAATT	2	30	85	2	14,23	7,1	464071	PGD
GGCTCCTCGA	1	15	5	1	7,12	7,1	370937	TAPBP
TGCTGCCTTT	1	15	22	1	7,12	7,1	660027	CAPNS2
TTGAATCCCC	4	59	17	4	27,99	7,0	112341	PI3
GTGCTGGACC	3	44	16	3	20,87	7,0	434081	PSME2
GCCCACACAG	5	73	36	5	34,63	6,9	1690	FGFBP1
GTGCGGAGGA	3	43	1	3	20,40	6,8	632144	SAA1
GTGGCCACGG	107	1515	3758	107	718,76	6,7	112405	S100A9
TAGGTGTCTA	2	28	4	2	13,28	6,6	374596	TPT1
TTGCTCACAA	2	28	13	2	13,28	6,6	572830	
CTGCTAAAAG	1	14	32	1	6,64	6,6	518198	CSTA
TGTGCCAGTG	1	14	104	1	6,64	6,6	331555	SPINK5
TGTATGTAAA	2	27	25	2	12,81	6,4	275464	KLK10
GGCCCAGGCC	3	40	216	3	18,98	6,3	531682	ALDH3A1

Tabela 3. Sessenta tags mais discriminativas com aumento de expressão em laringe N+ versus laringe normal, segundo Silveira *et al.*, (2008). São apresentadas as frequências absolutas e normalizadas de cada tag nas bibliotecas de tumor e tecido normal, Unigene ID e símbolo do gene de acordo com a base de dados *SAGEmap*. A: biblioteca de laringe N+, NA: biblioteca de laringe N0, N: biblioteca de tecido normal.

	Frequência Absoluta			Frequencia Normalizada			Anotação <i>SAGEmap</i>	
Tag	A	NA	N	A	N	A / N	Unigene ID	Símbolo do gene
GTCTCTTGGG	72	1	1	72	0,44	162,2	594095	CMIP
CACCTAATGG	67	5	1	67	0,44	150,9	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
ATATTCTTTG	154	7	4	154	1,78	86,7	515947	NBPF10
GGTTGAAAAA	36	0	1	36	0,44	81,1	446545	
GACTCTTCAG	24	2	1	24	0,44	54,1	534293	SERPINA3
CTCGAGCGGC	18	4	1	18	0,44	40,6	476052	SNRK
TTCGGTTGGT	17	6	1	17	0,44	38,3	172928	COL1A1
GTCATAGCTG	14	9	1	14	0,44	31,5	459790	VPS13A
TGGCCCCAGG	13	15	1	13	0,44	29,3	110675	APOC1
GATCTCTTGT	12	0	1	12	0,44	27,0	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CTGGGTATA	12	3	1	12	0,44	27,0	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CTCCTTAAGA	11	4	1	11	0,44	24,8	699303	GOSR1
CCTTGACCAA	11	16	1	11	0,44	24,8	369052	SELT
CCAGGGGAGA	51	186	5	51	2,22	23,0	532634	IFI27
GTTATAATAC	20	7	2	20	0,89	22,5	510078	SGK
CAGCCTGGGG	10	0	1	10	0,44	22,5	72026	PRSS21
CCTAGACTGG	10	0	1	10	0,44	22,5	522746	CLDN2
GCATTAATAG	10	1	1	10	0,44	22,5	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GATAATTCTT	19	0	2	19	0,89	21,4	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CCCCCTGCAG	18	3	2	18	0,89	20,3	408488	MSLN
CCTATCAGTA	9	0	1	9	0,44	20,3	255462	MSMB
TTCGGGTGTG	9	4	1	9	0,44	20,3	592049	PLK1
GGATTGGCCT	52	30	6	52	2,66	19,5	437594	RPLP2
CAGGTTTCAT	326	95	40	326	17,76	18,4	483444	CXCL14
TGGAAATGAC	40	28	5	40	2,22	18,0	172928	COL1A1
ACCCTGCCAA	16	16	2	16	0,89	18,0	193832	GPATCH4
AATTTCCAGT	8	0	1	8	0,44	18,0	98785	FGFBP2
CCCATCGCCC	8	2	1	8	0,44	18,0	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	

CTGGGACTGA	8	12	1	8	0,44	18,0	515255	LSM4
CCAATAAAGT	31	0	4	31	1,78	17,5	529571	RBP1
TGCTGCCTGT	28	91	4	28	1,78	15,8	118110	BST2
ATCAAAGGTT	14	7	2	14	0,89	15,8	357004	OLFML2A
GGAATGAGAA	7	0	1	7	0,44	15,8	373550	TGIF1
TGAGGTTCCC	7	1	1	7	0,44	15,8	483444	CXCL14
ATAAAGCTAC	7	3	1	7	0,44	15,8	533543	F8A1
ATGTGAAGAG	73	44	11	73	4,88	15,0	111779	SPARC
GCAACTTAGA	13	19	2	13	0,89	14,6	591484	LAMC2
CGCCGACGAT	45	552	7	45	3,11	14,5	523847	IFI6
AGGCTCCTGG	31	6	5	31	2,22	14,0	483444	CXCL14
GCCAGGTTGC	12	0	2	12	0,89	13,5	374191	LEPREL1
GACCACCTTT	12	1	2	12	0,89	13,5	389137	MFAP2
ACCAAAAACC	12	5	2	12	0,89	13,5	172928	COL1A1
ACCCTGGGCA	6	1	1	6	0,44	13,5	654792	NADK
CGGCTGCCCA	6	1	1	6	0,44	13,5	349470	SNCG
TTGGGCCTCT	6	1	1	6	0,44	13,5	632703	RPL41
AAAAATAAAA	6	2	1	6	0,44	13,5	396358	TMEM106B
TCAACAGCGT	6	2	1	6	0,44	13,5	591054	BID
GTCCTGGAGG	6	5	1	6	0,44	13,5	476697	
GCCCCCTGCT	6	5	1	6	0,44	13,5	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
AGATTCAAAC	6	7	1	6	0,44	13,5	108029	SH3BGRL
TTTGTTGTAT	6	9	1	6	0,44	13,5	584957	TOR3A
CCATAATGTT	6	10	1	6	0,44	13,5	170473	PLEK2
TTGAATTCCC	17	8	3	17	1,33	12,8	269109	SEMA3C
TTATGTTTAA	17	17	3	17	1,33	12,8	406475	LUM
GCATAAATAG	11	1	2	11	0,89	12,4	381123	RPL21
TTTCTGTATG	11	9	2	11	0,89	12,4	180877	H3F3B
CCTTTGAACA	20	7	4	20	1,78	11,3	444600	BOLA2
TCAGACTTTG	10	5	2	10	0,89	11,3	656473	DTL
AGCCTTG GTA	5	0	1	5	0,44	11,3	533258	CEL
TAATAAAAGG	5	0	1	5	0,44	11,3	512675	RPS8
CCTTCCAATT	5	1	1	5	0,44	11,3	659997	FHAD1

Tabela 4. Sessenta tags mais discriminativas com redução de expressão em laringe N+ versus laringe normal, segundo Silveira *et al.*, (2008). São apresentadas as frequências absolutas e normalizadas de cada tag nas bibliotecas de tumor e tecido normal, Unigene ID e símbolo do gene de acordo com a base de dados *SAGEmap*. A: biblioteca de laringe N+, NA: biblioteca de laringe N0, N: biblioteca de tecido normal.

	Frequência Absoluta			Frequência Normalizada			Anotação <i>SAGEmap</i>	
Tag	A	NA	N	A	N	N / A	Unigene ID	Símbolo do gene
AAAGCGGGGC	1	6	823	1	365,32	365,3	654550	KRT13
GCCCTATGCG	1	35	156	1	69,25	69,2	441280	LYPD2
GGAGGTGAGA	1	0	112	1	49,72	49,7	697198	
CTCTAACTTC	1	0	110	1	48,83	48,8	408153	PRR4
TGTGCCAGTG	1	14	104	1	46,16	46,2	331555	SPINK5
CTCCCCAAG	4	221	341	4	151,37	37,8	648398	IGHA1
GGGTCTGAGG	3	57	218	3	96,77	32,3	657412	
GGCCAGGCC	3	40	216	3	95,88	32,0	531682	ALDH3A1
AAAATAAACC	1	8	71	1	31,52	31,5	192233	PPL
CTCCCCAAA	2	133	138	2	61,26	30,6	648398	IGHA1
GCGGAGGTGG	1	30	66	1	29,30	29,3	648398	IGHA1
TTTCCTGCTC	28	706	1845	28	818,97	29,2	139322	SPRR3
TAATTTGCGT	3	0	194	3	86,11	28,7	696241	EMP1
CGTGGGGCTG	1	1	63	1	27,96	28,0	298023	AQP5
GCTTTTTTTG	1	37	63	1	27,96	28,0	654435	AKR1A1
GTGGGCCACG	1	3	46	1	20,42	20,4	648398	IGHA1
TACCTGCAAA	1	39	46	1	20,42	20,4	647047	NCF1
AGGGTGGTGA	2	4	90	2	39,95	20,0	451636	LOC342897
CGGGAGCGCT	3	31	131	3	58,15	19,4	148590	CNFN
CGGCTGAATT	2	30	85	2	37,73	18,9	464071	PGD
TCCAGGGGCC	1	27	40	1	17,76	17,8	170835	UCHL5IP
ATGACAGATG	1	3	37	1	16,42	16,4	654864	HOP
GTGGCCACGG	107	1515	3758	107	1668,13	15,6	112405	S100A9
GTAAAACCCG	1	5	34	1	15,09	15,1	620532	A2ML1
CTGCTAAAAG	1	14	32	1	14,20	14,2	518198	CSTA
GTGCCCCTGC	2	94	63	2	27,96	14,0	524219	TPI1
GCTTTTCTGG	1	3	30	1	13,32	13,3	139322	SPRR3
TGTAAGGCAG	1	5	28	1	12,43	12,4	331555	SPINK5

TGTGAAGCCT	1	0	26	1	11,54	11,5	331555	SPINK5
AGAAAGATGT	57	237	1337	57	593,48	10,4	494173	ANXA1
CTTCTACTAA	2	55	46	2	20,42	10,2	522401	FAM129B
CCCTACCCTG	1	0	23	1	10,21	10,2	522555	APOD
CTCACCGCCC	1	6	22	1	9,77	9,8	405662	CRABP2
GTGGCACGTG	1	8	22	1	9,77	9,8	437191	PTRF
TGCTGCCTTT	1	15	22	1	9,77	9,8	660027	CAPNS2
GCGGCCACGG	1	2	21	1	9,32	9,3	517729	MLC1
TCAACGGTGT	1	5	21	1	9,32	9,3	306242	RANBP9
TGGCGTACGG	1	11	21	1	9,32	9,3	586701	
GGGTTGGCTT	1	22	21	1	9,32	9,3	523084	SFTPA2B
CAACTAATTC	2	5	41	2	18,20	9,1	436657	CLU
TACCTGCAGA	194	3907	3948	194	1752,47	9,0	416073	S100A8
GTACGTATTC	10	50	200	10	88,78	8,9	676758	
TTCCTCCACG	1	2	20	1	8,88	8,9	436500	DBNL
TACCTTGACG	1	4	20	1	8,88	8,9	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
TGCCTGCAGA	1	17	20	1	8,88	8,9	661757	
AGGTCTGCCA	1	3	19	1	8,43	8,4	567256	AKR1C2
ACTTTTTCAA	10	125	187	10	83,01	8,3	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
AGGATGTGGG	2	12	37	2	16,42	8,2	435120	KIF1C
ATGAGCTGAC	23	98	414	23	183,77	8,0	695	CSTB
ATCCCTTGCT	1	3	18	1	7,99	8,0	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GGGCAGGCGT	1	7	18	1	7,99	8,0	501629	IER2
CCTGGGAAGT	1	35	18	1	7,99	8,0	89603	MUC1
CTGATGGCGA	4	20	71	4	31,52	7,9	655453	ZFAND1
TGGTTGGTGG	1	0	17	1	7,55	7,5	632215	PLLP
ACTCGTATAT	1	1	17	1	7,55	7,5	81134	IL1RN
ACTCAGTAGC	1	2	17	1	7,55	7,5	318894	GPR126
GGCCCATATG	1	2	17	1	7,55	7,5	653859	EHF
AGCCACCACG	1	5	17	1	7,55	7,5	232054	SLC47A1
ACTGCCCCGT	3	2	50	3	22,19	7,4	81071	ECM1
GGGCGGGTCC	1	2	16	1	7,10	7,1	381282	TYRO3
GGAGTGTGCG	1	41	16	1	7,10	7,1	4944	C9orf58

Tabela 5. Sessenta tags mais discriminativas com aumento de expressão em laringe N0 versus laringe normal, segundo Silveira *et al.*, (2008). São apresentadas as frequências absolutas e normalizadas de cada tag nas bibliotecas de tumor e tecido normal, Unigene ID e símbolo do gene de acordo com a base de dados *SAGEmap*. A: biblioteca de laringe N+, NA: biblioteca de laringe N0, N: biblioteca de tecido normal.

	Frequência Absoluta			Frequência Normalizada			Anotação <i>SAGEmap</i>	
Tag	A	NA	N	NA	N	NA / N	Unigene ID	Símbolo do gene
CGCCGACGAT	45	552	7	261,89	3,11	84,3	523847	IFI6
GTGCGGAGGA	3	43	1	20,40	0,44	46,0	632144	SAA1
ACCATTGGAT	4	38	1	18,03	0,44	40,6	458414	IFITM2
CCAGGGGAGA	51	186	5	88,24	2,22	39,8	532634	IFI27
TGCTGCCTGT	28	91	4	43,17	1,78	24,3	118110	BST2
GTGAACTAA	0	22	1	10,44	0,44	23,5	132660	KIAA1467
CAGCTGGCCC	4	43	2	20,40	0,89	23,0	654380	KRT14
AATCTGCGCC	9	85	4	40,33	1,78	22,7	458485	ISG15
GTGCGCCGGA	1	39	2	18,50	0,89	20,8	2785	KRT17
CTTGTAATCC	3	52	3	24,67	1,33	18,5	493709	NOL6
TGGGTGAAAA	1	17	1	8,07	0,44	18,2	359698	DDC
GATGTGCACG	40	162	10	76,86	4,44	17,3	654380	KRT14
CCTTGACCAA	11	16	1	7,59	0,44	17,1	369052	SELT
TGGCCCCAGG	13	15	1	7,12	0,44	16,0	110675	APOC1
CTTCCTGCCT	0	15	1	7,12	0,44	16,0	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CACTTCAAGG	15	88	6	41,75	2,66	15,7	521903	LY6E
GAGCAGCGCC	40	239	17	113,39	7,55	15,0	112408	S100A7
GTACTAGTGT	0	14	1	6,64	0,44	15,0	303649	CCL2
TCATTTTCCA	0	14	1	6,64	0,44	15,0	540696	SLC6A8
AGTGTGGAAG	0	14	1	6,64	0,44	15,0	654380	KRT14
AGCCCTTCCT	5	13	1	6,17	0,44	13,9	237856	SLC15A3
AAAGCAGTTT	5	26	2	12,34	0,89	13,9	114309	APOL1
TCACAGTGCC	4	26	2	12,34	0,89	13,9	476448	FLNB
ACCTCCACTG	2	13	1	6,17	0,44	13,9	112457	KRTDAP
GAGATAAAGC	2	13	1	6,17	0,44	13,9	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
TTTTATGGAA	1	13	1	6,17	0,44	13,9	77269	GNAI2
GTGCTGATTC	10	38	3	18,03	1,33	13,5	476218	COL7A1
CTGGGTGCCT	10	88	7	41,75	3,11	13,4	89545	PSMB4

CTGGGACTGA	8	12	1	5,69	0,44	12,8	515255	LSM4
CTATGAGCAG	0	12	1	5,69	0,44	12,8	516301	IL1F5
TGGATCAGTC	0	12	1	5,69	0,44	12,8	53454	TOPBP1
TGGTGACAAA	0	12	1	5,69	0,44	12,8	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
CAGCTGGCAA	3	23	2	10,91	0,89	12,3	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
TCCTCAAGAT	5	11	1	5,22	0,44	11,8	509791	ERH
GCAAAAAAAT	0	11	1	5,22	0,44	11,8	522310	NANS
ACTCCCAAAA	0	11	1	5,22	0,44	11,8	406683	RPS15
AAGCTAATAA	0	11	1	5,22	0,44	11,8	201978	PTGS1
TAAATAATTT	2	33	3	15,66	1,33	11,8	1197	HSPE1
AGCTTCCACC	1	32	3	15,18	1,33	11,4	490252	SPRR2F
GAATAAATGT	1	21	2	9,96	0,89	11,2	103934	FKBP9
CCATAATGTT	6	10	1	4,74	0,44	10,7	170473	PLEK2
GGGGGAATTT	1	10	1	4,74	0,44	10,7	522257	
GCAGGCCTCA	1	10	1	4,74	0,44	10,7	301350	FXVD3
GAAAAAATAGT	1	10	1	4,74	0,44	10,7	521461	NEFL
GAGGGAGCAC	0	10	1	4,74	0,44	10,7	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
TGAAATCTTT	0	10	1	4,74	0,44	10,7	527193	RPS23
CTTCTTGCCT	0	10	1	4,74	0,44	10,7	449630	HBA1
TGGAGATCTC	0	10	1	4,74	0,44	10,7	50098	NDUFA4
TGCTAAAAAA	9	30	3	14,23	1,33	10,7	474751	MYH9
GCAACTTAGA	13	19	2	9,01	0,89	10,2	591484	LAMC2
GAGATAATGA	5	19	2	9,01	0,89	10,2	415762	LY6D
GTCATAGCTG	14	9	1	4,27	0,44	9,6	459790	VPS13A
TTTGTTGTAT	6	9	1	4,27	0,44	9,6	584957	TOR3A
CAGCTCATCT	2	9	1	4,27	0,44	9,6	6396	JTB
TCCGTGGTTG	2	18	2	8,54	0,89	9,6	201641	BASP1
AAGATAAATG	1	9	1	4,27	0,44	9,6	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
AAAATAAACA	1	9	1	4,27	0,44	9,6	676357	MEPE
GTGCTGGTGC	1	18	2	8,54	0,89	9,6	9613	ANGPTL4
TGCCCTGAA	1	18	2	8,54	0,89	9,6	441975	XAF1
ATGTCTCAAA	0	9	1	4,27	0,44	9,6	495961	CXorf38
CTGTCACCTG	0	9	1	4,27	0,44	9,6	46320	SPRR1A

Tabela 6. Sessenta tags mais discriminativas com redução de expressão em laringe N0 versus laringe normal, segundo Silveira *et al.*, (2008). São apresentadas as frequências absolutas e normalizadas de cada tag nas bibliotecas de tumor e tecido normal, Unigene ID e símbolo do gene de acordo com a base de dados *SAGEmap*. A: biblioteca de laringe N+, NA: biblioteca de laringe N0, N: biblioteca de tecido normal.

	Frequência Absoluta			Frequência Normalizada			Anotação <i>SAGEmap</i>	
Tag	A	NA	N	NA	N	N / NA	Unigene ID	Símbolo do gene
GTGGAAGACG	0	1	468	0,47	207,74	437,9	80395	MAL
AAAGCGGGGC	1	6	823	2,85	365,32	128,3	654550	KRT13
GGCAGAGAAG	0	4	531	1,90	235,70	124,2	697198	
GCTTCCTCGG	0	1	127	0,47	56,37	118,8	459284	RHCG
CGTGGGGCTG	1	1	63	0,47	27,96	58,9	298023	AQP5
GACATCAAGT	9	1	55	0,47	24,41	51,5	654568	KRT19
GTGGCCACG	0	1	46	0,47	20,42	43,0	695954	IL6R
TAAAGCCTGA	0	1	35	0,47	15,54	32,7	146239	LOC374569
TCTGGAGGAG	0	1	30	0,47	13,32	28,1	665267	KRT78
ACTGCCCGCT	3	2	50	0,95	22,19	23,4	81071	ECM1
AGGGTGGTGA	2	4	90	1,90	39,95	21,1	451636	LOC342897
CAATGTACTT	0	1	21	0,47	9,32	19,6	201877	TMPRSS11E
TGTGAGGTCT	0	1	19	0,47	8,43	17,8	331555	SPINK5
ATGGGGGTGA	4	1	17	0,47	7,55	15,9	654660	MFSD5
ATCGTGGCGG	2	1	17	0,47	7,55	15,9	699253	CLDN4
ACTCGTATAT	1	1	17	0,47	7,55	15,9	81134	IL1RN
CCAGCGCCAA	5	2	32	0,95	14,20	15,0	631594	LYPD3
TTAGATCGTT	1	1	16	0,47	7,10	15,0	43233	TSPAN6
GTGGGCCACG	1	3	46	1,42	20,42	14,3	648398	IGHA1
GCGGCCATCC	2	1	14	0,47	6,21	13,1	79625	C20orf149
GCTGTGCCTG	0	1	14	0,47	6,21	13,1	654513	PRSS3
ATAATTGGAA	0	1	14	0,47	6,21	13,1	643431	IGJ
CCCTTCTATA	1	1	13	0,47	5,77	12,2	632641	TMED4
GACGTTCACT	0	1	13	0,47	5,77	12,2	464071	PGD
GGTGGGCCAC	0	1	13	0,47	5,77	12,2	644326	PACS1
ATGTAAAAAA	9	8	103	3,80	45,72	12,0	695929	LYZ
CGTGGGACAC	0	12	149	5,69	66,14	11,6	110196	CRCT1
ATGACAGATG	1	3	37	1,42	16,42	11,5	654864	HOP

AGACATAAAT	0	3	36	1,42	15,98	11,2	[* TAG NOT FOUNDED IN MAP *]	
GGCTGCCTGC	2	1	12	0,47	5,33	11,2	569809	ARHGAP27
ACACACTCCA	2	2	24	0,95	10,65	11,2	408061	FABP5
TCCTTCAACG	0	1	12	0,47	5,33	11,2	139322	SPRR3
GTCTGGGGGA	0	1	12	0,47	5,33	11,2	277035	MGLL
GCTAACCCCT	0	1	12	0,47	5,33	11,2	534458	TPPP3
TACCCTGCAG	0	2	24	0,95	10,65	11,2	468415	PIGF
GACCTCCGGG	0	3	35	1,42	15,54	10,9	2022	TGM3
GTGGCGTGCA	0	3	35	1,42	15,54	10,9	445387	RPS6KA3
GGCGTCTGCC	0	9	101	4,27	44,83	10,5	512469	MGC59937
CCACTACACT	11	1	11	0,47	4,88	10,3	478275	TNFSF10
CCTATGGCTT	4	1	11	0,47	4,88	10,3	22242	ECHDC3
GGAGCGTGGG	3	1	11	0,47	4,88	10,3	286226	MYO1C
GCTTTCATTG	1	1	11	0,47	4,88	10,3	643846	NUCKS1
CAAAGCCCTG	0	1	11	0,47	4,88	10,3	75264	ZNF510
GAGATGAGCG	0	1	11	0,47	4,88	10,3	448277	C6orf205
CACACACCAG	0	1	11	0,47	4,88	10,3	567664	SPNS2
ATTCCTTGA	0	1	11	0,47	4,88	10,3	694721	CD24
AGTGTGAAGC	0	1	11	0,47	4,88	10,3	654610	KRT4
TAGAAAGGCA	10	2	21	0,95	9,32	9,8	503093	ZFP36L2
GCGGCCACGG	1	2	21	0,95	9,32	9,8	517729	MLC1
GAGCAGGAGC	4	1	10	0,47	4,44	9,4	438782	HDAC5
AAGAAGCAGG	4	1	10	0,47	4,44	9,4	523262	TMEM59
TGTGCCCTGA	2	1	10	0,47	4,44	9,4	580427	HPCAL1
CTTCTGTGTA	2	1	10	0,47	4,44	9,4	136778	USP10
AGTTGTCCCG	1	1	10	0,47	4,44	9,4	148078	UBR4
TTCCTCCACG	1	2	20	0,95	8,88	9,4	436500	DBNL
GCTTTTCTGG	1	3	30	1,42	13,32	9,4	139322	SPRR3
TCAGTATTCT	0	1	10	0,47	4,44	9,4	528605	LOC643008
GCTTGATGAA	0	1	10	0,47	4,44	9,4	494173	ANXA1
GCTTTCTCAC	48	5	48	2,37	21,31	9,0	546269	RPL10A
GAATCTGGAG	0	2	19	0,95	8,43	8,9	584864	LTB4DH
TATCACAGTC	0	2	19	0,95	8,43	8,9	254338	GBP6

Apêndice

(Co-autoria em trabalho desenvolvido
sobre as interações câncer-estroma)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions

Flávia C Rodrigues-Lisoni^{1,8}, Paulo Peitl Jr², Alessandra Vidotto¹, Giovana M Polachini¹, José V Maniglia³, Juliana Carmona-Raphe¹, Bianca R Cunha¹, Tiago Henrique¹, Caique F Souza^{1,4}, Rodrigo AP Teixeira², Erica E Fukuyama⁵, Pedro Michaluart Jr⁶, Marcos B de Carvalho⁷, Sonia M Oliani², Head and Neck Genome Project GENCAPO⁹, Eloiza H Tajara^{1,4*}

Abstract

Background: The development and progression of cancer depend on its genetic characteristics as well as on the interactions with its microenvironment. Understanding these interactions may contribute to diagnostic and prognostic evaluations and to the development of new cancer therapies. Aiming to investigate potential mechanisms by which the tumor microenvironment might contribute to a cancer phenotype, we evaluated soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells which may influence proliferation and gene and protein expression.

Methods: The study was carried out on the epithelial cancer cell line (Hep-2) and fibroblasts isolated from a primary oral cancer. We combined a conditioned-medium technique with subtraction hybridization approach, quantitative PCR and proteomics, in order to evaluate gene and protein expression influenced by soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells.

Results: We observed that conditioned medium from fibroblast cultures (FCM) inhibited proliferation and induced apoptosis in Hep-2 cells. In neoplastic cells, 41 genes and 5 proteins exhibited changes in expression levels in response to FCM and, in fibroblasts, 17 genes and 2 proteins showed down-regulation in response to conditioned medium from Hep-2 cells (HCM). Nine genes were selected and the expression results of 6 down-regulated genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*) were validated by real time PCR.

Conclusions: A significant and common denominator in the results was the potential induction of signaling changes associated with immune or inflammatory response in the absence of a specific protein.

Background

Solid tumors are characterized by the presence of two major components: neoplastic cells and a specialized nonmalignant stroma in which they are immersed and are essential for their survival and proliferation. In carcinomas, a basement membrane is usually present between these components [1,2].

The tumor stroma is distinguished by an enrichment of microvessel density, abundance of endothelial cells and precursors, inflammatory cells including lymphocytes, neutrophils, macrophages, dendritic and mast cells, and a connective tissue with fibroblasts, myofibroblasts and

histiocytes responsible for remodeling and deposition of extracellular matrix (ECM) components - fibronectin, collagens, elastin, and glycosaminoglycans [2-4]. Although these cells are nonmalignant, they have a unique gene expression pattern, compared to stroma cells in normal tissues [5,6].

Substantial evidence indicates that the development and the progression of cancer not only depend on its genetic characteristics but also on interactions with its microenvironment [4,7,8]. In fact, tumor cells may alter the surrounding stroma through direct cell contact or via the secretion of paracrine soluble factors, inducing cell differentiation or extracellular matrix modifications [9]. In its turn, stromal cells may promote cancer progression and acquisition of invasiveness [10-12]. It is

* Correspondence: tajara@famerp.br

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil

possible that such interactions contribute to the neoplastic cell phenotype and behavior as observed during the normal development process and function of organs and tissues [13,14]. As Albini and Sporn (2008) appropriately propose, the microenvironment may be more than a partner but also an essential component of the cancer, and both should be considered as a functional whole [15].

In this context, inflammation and infection have gained special attention. Well known examples connecting infection-related or -unrelated chronic inflammation and increased risk for cancer development are described in the literature [16], and probably more than 15% of cancers are linked to these factors [17]. TNF- α and NF- κ B transcription factor should play a central role in this process, modulating transcription of genes encoding angiogenic and growth factors, inflammatory cytokines and anti-apoptotic proteins [16]. In fact, many inflammatory mediators may influence cell proliferation and tumor development, as demonstrated by our recent studies on annexin A1 [18-20].

Macrophages represent one of the main inflammatory regulators in tumor stroma and are responsible for proliferation, invasion and immunosuppressive signaling, with the production of angiogenic and growth factors, chemokines, cytokines and matrix metalloproteinases [21]. The key partners of macrophages in this network are fibroblasts, the so-called carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), which significantly increase the growth of neoplastic or normal cells [22,23] and can enhance tumor engraftment and metastasis in animal models [24]. Recently, Hawsawi et al. (2008) [25] observed well-defined differences in gene expression and proteomic profiles between activated CAFs and fibroblasts from normal stroma, emphasizing their importance in the cancer process.

Regardless of the fact that they are easily identified by their morphology, specific cellular markers for fibroblasts remain unknown, presumably because of their large diversity [26]. In tumor stroma, fibroblasts present a phenotype similar to those associated with wound healing, with a large and euchromatic nucleus and prominent rough endoplasmic reticulum [27,28]. These signals mediating the transition of normal to reactive fibroblasts are still not completely defined.

Many studies have analyzed the role of fibroblasts in cancer initiation and progression. To address this issue, several approaches have been used, as co-culture of cancer cells and fibroblasts and cultures with conditioned medium, combined or not with *in vivo* experiments. The data have shown that these cells, similar to macrophages, overexpress chemokines, interleukines, growth factors and matrix metalloproteinases, promoting inflammatory responses and facilitating angiogenesis,

cancer-cell invasion and proliferation [29-31]. In head and neck cancer, for example, *in vitro* experiments have suggested that the presence of fibroblasts is essential for invasive features either because cancer cells express higher levels of matrix metalloproteinases in the presence of fibroblasts [32,33] or because cancer-associated fibroblasts themselves synthesize these proteins [34,35].

Much of the answer to the question of tumor-stroma interactions lies in the identity of ligands, receptors and effectors of signaling patterns expressed by stroma and tumor cells. Numerous growth factors, cytokines, chemokines, hormones, enzymes and cells responsible for their expression have been characterized but the cross-signaling between pathways in this complex network is far from solved [7,36]. Adding complexity to the scenario, the chemomechanical environment of the extracellular matrix may also act in concert with signaling pathways and affect the cancer process [37].

An important perspective in the study of tumor stroma is the potential use of the gene expression pattern of their cells for diagnostic or prognostic evaluation and as a target for therapy. Supporting this idea are the results from studies on outcome prediction and molecular marker analysis of the stroma [6,38], drugs targeting inflammatory cells [39] and mediators of angiogenesis [40,41].

In order to investigate potential mechanisms by which the tumor microenvironment might contribute to cancer phenotype, we asked whether soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells *in vitro* may influence proliferation, and gene and protein expression. For these purposes, we exploited purified fibroblasts isolated from a primary oral cancer and an epithelial cancer cell line linked by conditioned medium and genomic and proteomic approaches. Both cells were treated with the conditioned medium of each other and submitted to analysis by rapid subtraction hybridization methodology, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Based on the results of the rapid subtraction hybridization (RaSH) approach, a comparative quantitative real-time PCR was performed to validate the expression of several genes, focusing on those involved in tumorigenesis and inflammation. The results pointed to the participation of several inflammatory mechanisms that might have biological significance in epithelial tumors.

Methods

Primary tumor samples

For conditioned medium experiments, a primary epidermoid (squamous cell) carcinoma of the retromolar area was obtained from a 49-year-old male patient, prior to radiation and/or chemotherapy. Twenty-four laryngeal and 23 oral tongue squamous cell carcinoma (SCC) samples from patients undergoing tumor resection were

used for gene expression analysis. All carcinoma samples were reviewed by senior pathologists and exhibited the presence of at least 70% tumor cells; the corresponding surgical margins were classified to be free of tumor cells.

The study protocol was approved by the National Committee of Ethics in Research (CONEP 1763/05, 18/05/2005), and informed consent was obtained from all patients enrolled.

Epithelial cancer cell line and primary tumor cell cultures

The Hep-2 cell line, originally established from an epidermoid carcinoma of the larynx (ATCC, Rockville, Maryland, USA), was seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flask (Corning, NY, USA) in medium MEM-Earle (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), pH 7.5, supplemented with 20% fetal calf serum (Cultilab), 1% non-essential amino acids, 0.1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), and cultured at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

A primary carcinoma of retromolar area sample showing epithelium and adjacent connective tissues was rinsed multiple times with 100× antibiotic and antimycotic solutions (Invitrogen) and minced into 2-4 mm fragments. Single-cell suspensions were obtained by digestion at 37°C for 1 hour with 40 mg/mL collagenase type I (Sigma Chemical, St Louis, USA). After centrifugation, the cells were washed with PBS, resuspended in DMEM medium supplemented with 20% fetal calf serum (Cultilab), 2 mM glutamine (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), and 0.1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen). The cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks (Corning) and cultured at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. Cell medium was changed at 72 h intervals until the cells became confluent. Since fibroblasts were mixed with the epithelial tumor cells at the time of initial plating, fibroblasts were selected by plating the cells growing in medium supplemented with 20% serum for at least 3 weeks [42-44].

Preparation of conditioned medium

Conditioned medium (CM) was prepared from Hep-2 cell or tumor stromal fibroblast cultures showing 80% confluence. Twenty-four, 48 and 72 hours after medium replacement, the supernatant or conditioned medium (CM24, CM48 and CM72, respectively) from three replicates was aspirated and filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore) to remove any cell debris and stored at -80°C. Before using, the CM was diluted 1:1 in complete medium. The dilution 1:1 and CM72 were chosen to maximize the chance of detecting a cell response to soluble factors. Optimization experiments showed that dilutions lower than 1:1 resulted in higher numbers of dead cells.

Hep-2 cell-conditioned medium is referred to as HCM and fibroblast-conditioned medium is referred to as FCM.

Growth curve

Hep-2 cells were seeded at a density of 5×10^4 cells in plastic 6-well plates in two sets of quadruplicates. Twenty-four hours later, when cells had already adhered, Hep-2 cultures were incubated with FCMs. One replica in each set was treated with self-conditioned medium and one replica was treated with complete medium.

Medium was replaced on day 4 and cell morphology was observed every day. After 1, 3, 5 and 7 days, cells were harvested and counted using a Neubauer hemocytometer. The same experiment was repeated twice.

Immunofluorescence analysis

The Hep-2 cell line or tumor stromal fibroblasts were grown in culture chambers (Nunc, Naperville, IL, USA) and, after 3 days, the chambers were carefully removed, and the slides with adherent cells were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde, 0.1 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.4, for 2 hours at 4°C. The slides were washed in the same buffer and incubated with 0.1% albumin bovine and 3% normal serum in PBS (PBSA) to block nonspecific binding. The cells were immunostained with primary mouse monoclonal antibodies (Ab) anti-vimentin (NCL-VIM-V9, Novocastra, Benton Lane, Newcastle, UK) or anti-cytokeratin (M3515, antibodies to all types of cytokeratins; AE1-AE3; Dako, Carpinteria, CA, USA) diluted at 1:200 in 1% PBSA, followed by overnight incubation at 4°C. For negative controls, the cells were incubated with nonimmune mouse serum (1:200 working dilution; Sigma-Aldrich). After repeated washings in 1% PBS, a goat anti-mouse IgG (Fc fragment-specific, Dako, Glostrup, Denmark) antibody conjugated to FITC (1:50; British BioCell International, Cardiff, UK) was added, followed by 1 hour incubation at room temperature. Thus, the cells were washed thoroughly in PBS. Analysis was conducted using an Axioskop 2 light microscope (Zeiss, GR) equipped with a digital camera. Digital images were captured by using software AxioVision (Zeiss, GR).

Immunohistochemical analysis

Apoptosis was assayed using AnxA5 staining as described [45]. Fixed Hep-2 cell line or tumor stromal fibroblast in slides from culture chambers were incubated with the following reagents: 2.1% sodium citrate for 30 min at 96°C; 3% hydrogen peroxide for 15 min; 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) diluted in 0.4% PBS for 15 min; non-specific binding sites were blocked with 10% albumin bovine (BSA) diluted in TBS (20 mM Tris

buffer in 0.9% NaCl, pH 8.2) for 30 min. The slides were then incubated overnight with a rabbit polyclonal antibody anti-AnxA5 (sc8300, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluted 1:200. After repeated washings in 1% PBSA, a goat anti-rabbit IgG (Fc fragment specific) antibody conjugated to 5 nm colloidal gold particles (N24916, Invitrogen) was added. Silver enhancing solution (L24919, Invitrogen) was used to augment gold particle staining. At the end of the reaction, cells were washed thoroughly in distilled water, counterstained with haematoxylin and examined using an Axioskop2 microscope (ZEISS, GR).

RNA extraction for Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) and real time PCR experiments

Hep-2 cells and stromal fibroblasts were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks in complete medium (controls) and in conditioned medium. Hep-2 cells and fibroblasts were cultured for 5 and 3 days, respectively, and harvested by addition of TRIzol Reagent, following treatment with DNase (Invitrogen). Total RNA from primary tumor samples was also extracted using TRIzol Reagent and treated with DNase. cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer.

RaSH

RaSH technique was performed as described by Jiang et al. (2000) [46]. Aliquots (20 µg) of total RNA from control cells (driver) or treated cells (tester) were used for double-stranded cDNA synthesis using standard protocols [47].

The cDNA was digested with MboI (Invitrogen) at 37°C for 3 h followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The digested cDNAs were mixed with the adaptors XPDN-14 5'-CTGATCACTC-GAGA and XPDN-12 5'-GATCTCTCGAGT (Sigma Chemical, final concentration 20 µM) in 30 µl of 1× ligation buffer (Gibco BRL), heated at 55°C for 1 min, and cooled down to 14°C within 1 h. After adding 3 µl of T4 DNA ligase (5 U/µl) (Gibco, BRL), ligation was carried out overnight at 14°C. After phenol/chloroform extraction and ethanol/glycogen precipitation, the mixtures were diluted to 100 µl with TE buffer (10 mM Tris/1 mM EDTA); 40 µl of the mixtures were used for PCR amplification.

The PCR mixtures were set up using 10 µM XPDN-18 5'-CTGATCACTCGAGAGATC, 0.4 mM dNTPs, 10 × PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Thermocycler conditions were one cycle at 72°C for 5 min, followed by 25 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, ending in a final extension at 72°C for 3 min. Ten µg of purified

PCR product (tester) was digested with 20U XhoI (Invitrogen) followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.

One-hundred nanograms of the tester cDNA were mixed with 5 µg of the driver cDNA in hybridization solution (0.5 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, SDS2% and 40% formamide) and, after heating at 95°C, incubated at 42°C for 48 h. After extraction and precipitation, the hybridization mixture (1 µg) was ligated with XhoI-digested pZero plasmid and transformed into competent bacteria. Bacterial colonies were picked and used as DNA template for PCR. Clones were sequenced using an automated DNA sequencer and sequence homologies were searched using the BLAST program [48]. Gene ontology (GO) annotation was used for the functional classification of up- and down-regulated genes [49].

Quantitative PCR

For validation experiments, cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks in two sets of quadruplicates. Twenty-four hours later, when cells had already adhered, Hep-2 culture replicas were treated with FCMs and fibroblast cultures were treated with HCMs. One replica in each set (control) was treated with self-conditioned medium. Hep-2 cells and fibroblasts were harvested after 5 and 3 days, respectively, and RNA was extracted as described above.

Nine differentially expressed genes were selected for validation by quantitative real time PCR experiments according to their direct or indirect involvement in tumorigenesis. Their expression was checked in treated samples relative to matched non-treated samples. One of these genes (*ARID4A*) was also selected for quantitative real time PCR validation in fresh tumor samples of 24 laryngeal SCC and in 23 oral tongue SCC relative to matched normal samples.

The primers were manually designed with: 19-23 bp length, 30-70% GC content and a short amplicon size (90-110 bp). Their sequences are available upon request. Real time PCR was performed in triplicate using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reaction mixture consisted of a 20 µl volume solution containing 10 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500 nM of each primer and 100 ng cDNA. The PCR conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95° for 15 s and 60° for 1 min. Melting curve analysis was performed for each gene to check the specificity and identity of the RT-PCR products.

For each primer set, the efficiency of the PCR reaction (linear equation: $y = \text{slope} + \text{intercept}$) was measured in triplicate on serial dilutions of the same cDNA sample. The PCR efficiency (E) was calculated by the formula $E = [10^{(-1/\text{slope})}]$ and ranged from 1.96 to 2.02 in the different assays.

Three control genes (*GAPDH*, *ACTB* and *TUBA6*) were used as internal standards. The relative expression ratio (fold change) of the target genes was calculated according to Pfaffl (2001) [50]. Statistical analysis was performed by a two-tailed unpaired *t* test using Graph-Pad prism software.

Proteomic analysis

Hep-2 cells and stromal fibroblasts were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks in complete medium and in conditioned medium, as described for RASH experiments. Hep-2 cells and fibroblasts were cultured for 5 and 3 days, respectively, and harvested by centrifugation at 3200 rpm for 5 min at 4°C. Cells were disrupted by sonication, proteins were isolated and two-dimensional electrophoresis (2-DE) was performed, as described by de Marqui et al. (2006) [51]. Briefly, isoelectric focusing was carried out in a IPGphor (GE Healthcare) using 13-cm immobilized pH 3-10 L gradient strips. Vertical 12.5% SDS-PAGE was performed in a SE 600 Ruby electrophoresis unit (GE Healthcare) and proteins were detected by Coomassie Blue staining. Differentially expressed proteins were excised from gel, destained, dried and in-gel tryptic-digested. Negative and positive control digests were performed on gel slices that contained no protein and on slices cut from a band of the molecular weight marker, respectively.

Samples were analyzed using MALDI Q-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Quadrupole Ion Filter - Time of Flight) Premier (Waters Corporation, Milford, MA, USA) mass spectrometer (MS/MS). Duplicate or triplicate runs of each sample were made to ensure an accurate analysis.

For protein identification, the resulting MS/MS data were interpreted by MASCOT software (MS/MS Ions Search) [52] and searched against the Mass Spectrometry Protein Sequence Database (MSDB). The UniProtKB/Swiss-Prot [53] database was used for the functional classification of up- and down- expressed proteins.

Data Handling and Statistical Analysis

Quantification of apoptotic cells was performed with a high magnification objective ($\times 40$) counting cells in 100 μm^2 areas and reported as mean $\pm$ SEM per group. Densitometric analysis for the immunofluorescence staining used an arbitrary scale ranging from 0 to 255 units. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance followed, if significant, by the Bonferroni test.

Results

Stromal fibroblasts: selection and immunofluorescence analysis

Fetal calf serum concentration and culture time provided a simple method of selecting fibroblasts from a

primary carcinoma of retromolar area. Fibroblast cultures at passage 78 still showed spindle-shaped cells, which displayed the typical fibroblast markers, weak cytokeratin and intense vimentin immunoreactivity in cytoplasm, after immunofluorescence analysis (Figure 1B, E). Staining was obtained with both antibodies (cytokeratin and vimentin) in Hep-2 cells (Figure 1C, F). No labeling was detected in sections incubated with the control nonimmune mouse serum (Figure 1A, D).

Ultrastructural analysis showed that the stromal fibroblasts present large euchromatic nuclei, more granular endoplasmatic reticulum, mitochondria and nucleoli than normal fibroblasts (data not shown). Therefore, the spontaneously immortalized cell line of fibroblasts retained the characteristics of stromal cells and may correspond to cancer-associated fibroblasts (CAF).

Conditioned medium inhibits proliferation and induces apoptosis

Growth curves of Hep-2 cells treated with FCM showed decreased proliferation (Figure 2). Growth inhibition was observed as early as day 1 and was statistically significant ($P < 0.05$) at day 3 and day 5.

The immunohistochemistry reaction with AnxA5 antibody showed the presence of gold particles on the cytoplasm of the Hep-2 apoptotic cells (Figure 3). The AnxA5 immunoreactivity was found more in the apoptotic process of Hep-2 cells incubated in FCM (56%) than in cells without the treatment (24%). Apoptotic cells displayed distinctive morphology, a notable decrease in the nuclear size, irregular shape and cytoplasmic blebbing.

Genes identified using the RaSH approach

A total of 81 clones from the Hep-2 cell line and fibroblast libraries were sequenced. In the Hep-2 cell line, forty-one genes exhibited changes in expression levels in response to FCM treatment (33 down- and 8 up-regulated) and, in fibroblasts, 17 genes showed down-regulation in response to HCM treatment. These genes are involved in response to stimulus, apoptosis, cell proliferation and differentiation, signal transduction, transcription, translation and transport (Table 1 and 2).

Real-time PCR validation of differentially expressed genes

Nine genes displaying down- (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *GPNUMB*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*) or up-regulation (*DAP3*, *PRDX1*) in Hep-2 cells treated with FCM were selected and the expression data for six down-regulated genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*) were confirmed by real time PCR (Figure 4A). Most results were, therefore, consistent with the RaSH data.

ARID4A expression was also analyzed in 24 pairs of tumor and matched normal tissues from laryngeal squamous cell carcinomas and in 23 pairs of tumor and matched normal tissues from oral tongue squamous cell carcinomas. *ARID4A* mRNA levels were decreased (≥ 2 -fold) in almost half of the squamous cell carcinomas samples (-1.04 to -6.9-fold change, 23 of 47 samples, i.e., 49%) and were increased in some of these samples (1.51 to 6.26-fold change, 7 of 47 samples, i.e., 15%) (Figure 4B). In contrast, no differences in transcript levels were observed between 17 of 47 samples (36%) and normal tissue. Therefore, similarly to the Hep-2 cell line, most

primary head and neck tumors (49%) showed down-regulation of *ARID4A* transcripts.

No differences were observed in respect to clinicopathological features between samples presenting up- and down-regulation of *ARID4A* transcripts (Additional file 1).

Proteomics approach

Comparison between 2-DE patterns from treated cells and controls revealed approximately 80 spots with significant differences in intensity. Seven proteins (Figure 5) showing expression level changes in response

to CM treatment were identified by MALDI-Q-TOF-MS mass spectrometry (Additional file 2). Five proteins (alpha enolase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C C1/C2, aldolase A, tubulin beta and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were down-regulated in Hep-2 cell line treated with conditioned medium (FCM72) and two proteins (vimentin and actin) were underexpressed in fibroblasts treated with Hep-2 cell line conditioned medium (HCM72). These proteins are involved in transcription, growth control, response to stimulus, RNA processing, glycolysis, cell motion and membrane trafficking.

Discussion

The molecular crosstalk between neoplastic and the surrounding tissue induces several stromal changes, including neoangiogenesis and immune/inflammatory reaction, as well as new extracellular matrix formation and the activation of fibroblast-like cells, a process known as desmoplasia [54], [55]. Initially, the desmoplastic response was considered a barrier against tumor invasion, but there is growing evidence that desmoplasia is an unfavorable prognostic factor. For example, Sis et al. [56] suggested that desmoplasia is related to increased risks of regional metastases, poorly differentiated

Table 1 Information on biological processes based on Gene ontology

Biological Process	Down-regulated genes
Cell communication	
signal transduction	<i>FAS, SQSTM1, YWHAZ</i>
Transcription	<i>ARID4A, CALR, MYC, PARP1, RNF10, SQSTM1</i>
Translation	<i>AARS, RPLP0, RPS17, RPS23</i>
Apoptosis	<i>CALR</i>
induction	<i>FAS</i>
anti-apoptosis	<i>TPT1, YWHAZ</i>
Cell migration	<i>TMSB4X</i>
Cell cycle	<i>DYNC1H1, MYC, PSMC6</i>
Cell proliferation	
negative regulation	<i>GPNMB, LDOC1</i>
positive regulation	<i>MYC</i>
Developmental process	
epidermis development	<i>UGCG</i>
Response to stimulus	
defense response	
inflammatory response	<i>LTA4H</i>
response to stress	<i>EIF2AK1, SQSTM1</i>
response to oxidative stress	
response to external stimulus	<i>EIF2AK1</i>
Transport	<i>CALR, NDUFA4, SQSTM1</i>
Metabolic process	<i>COX7C, OLA1,</i>
protein metabolic process	<i>PARP1, SQSTM1, USP9X</i>
protein modification process	<i>GRPEL2, HSP90AB1, PPP2R2A, PRPF4B, USP48</i>
lipid metabolic process	<i>LTA4H, UGCG</i>
DNA repair	<i>PARP1</i>
RNA processing	<i>PRPF4B, SF3B1</i>
Cellular homeostasis	<i>CALR, MYC, RPS17</i>
No classification	<i>GNB2L1, RCN1</i>
	Up-regulated genes
Transcription	<i>ENO1</i>
Translation	<i>EIF1, TARS</i>
Apoptosis	<i>RTN3</i>
induction	<i>DAP3</i>
Cell proliferation	<i>PRDX1</i>
negative regulation	<i>ENO1</i>
Developmental process	
organ development	<i>PRDX1</i>
Response to stimulus	
response to stress	<i>EIF1, RTN3</i>
Metabolic process	<i>PRDX1</i>
protein metabolic process	
protein modification process	<i>P4HB</i>
nucleic acid metabolic process	
RNA processing	<i>USP39</i>

Top down- and up-regulated genes selected by RaSH in Hep-2 samples treated with FCM.

Table 2 Information on biological processes based on Gene Ontology

Biological Process	Down-regulated genes
Cell communication	
signal transduction	<i>S100A6, FN1</i>
Transcription	<i>FOSL1</i>
Translation	<i>RPL37A, RPL7, RPL19, RPL27A, RPLP0</i>
Apoptosis	<i>CTSB</i>
anti-apoptosis	<i>TPT1</i>
Cell adhesion	<i>FN1</i>
Cell proliferation	
positive regulation	<i>S100A6, FOSL1</i>
Developmental process	
organ development	
epidermis development	<i>COL1A1</i>
Response to stimulus	
defense response	<i>FOSL1</i>
response to stress	<i>FN1</i>
Transport	<i>ERGIC3, STX4</i>
Metabolic process	
protein metabolic process	<i>CTSB</i>
RNA processing	<i>PRPF3</i>
No classification	<i>CIZ1, POLE4</i>

Top down-regulated genes selected by RaSH in CAF samples treated with HCM.

primary tumors and lymphatic and venous invasion in colorectal carcinoma. Similar results were observed for head and neck squamous cell carcinomas, which show a high risk of neck recurrence in presence of a desmoplastic stromal pattern [57].

In the present study, we investigated the influence of soluble paracrine factors produced *in vitro* by stromal cells derived from an oral carcinoma and by a neoplastic epithelial cell line on proliferation and gene/protein expression. First, we noted that conditioned medium from stromal fibroblast cultures inhibited Hep-2 cell line proliferation and induced apoptosis, suggesting that factors secreted by fibroblasts include proteins that interfere in cell growth and death of neoplastic cells. In addition, using rapid subtraction hybridization and proteomic analysis, we identified gene products generated by stromal and neoplastic cells that may influence proliferation, differentiation and apoptosis, or drive response to stimulus.

Down-regulated genes in neoplastic cells treated with FCM are involved in signal transduction (*FAS, SQSTM1, YWHAZ*), transcription (*ARID4A, CALR, MYC, PARP1, RNF10, SQSTM1*), translation (*AARS, RPLP0, RPS17, RPS23*), apoptosis (*CALR, FAS, TPT1, YWHAZ*), cell migration (*TMSB4X, GNB2L1*), cell cycle and cell proliferation (*DYNC1H1, GPNMB, LDOC1, MYC, PSM*),

Figure 4 Real-time PCR gene expression in a conditioned medium-treated neoplastic cell line and in primary tumors. (A) Expression of *ARID4A*, *CALR*, *DAP3*, *GNB2L1*, *PRDX1*, *RNF10*, *SQSTM1* and *USP9X* genes in Hep-2 cells treated with conditioned medium from fibroblast cultures. (B). *ARID4A* gene expression in 47 laryngeal and oral tongue carcinomas. Relative quantitation of target gene expression for each sample was calculated according to Pfaffl [50]; *GAPDH* was used as the internal reference and control sample as the calibrator. Values were Log2 transformed (y-axis) so that all values below -1 indicate down-regulation in gene expression while values above 1 represent up-regulation in tumor samples compared to normal samples.

epidermis development (*UGCG*), response to stimulus (*EIF2AK1*, *LTA4H*, *SQSTM1*), transport (*CALR*, *NDUFA4*, *SQSTM1*) and different metabolic processes (*USP9X*). Up-regulated genes are also involved in transcription and translation (*ENO1*, *EIF1*, *TARS*), apoptosis (*DAP3*, *RTN3*), cell proliferation (*PRDX1*, *ENO1*), organ development (*PRDX1*), response to stress (*EIF1*, *RTN3*) and metabolic processes (*PRDX1*, *P4HB*, *USP39*).

In fibroblasts treated with HCM, the biological processes of down-regulated genes include signal transduction (*S100A6*, *FN1*), transcription and translation (*FOSL1*, *RPL37A*, *RPL7*, *RPL19*, *RPL27A*, *RPLP0*), apoptosis (*CTSB*, *TPT1*), cell proliferation (*S100A6*, *FOSL1*), epidermis development (*COL1A1*), response to stimulus (*FN1*, *FOSL1*), transport (*ERGIC3*, *STX4*) and protein and RNA metabolism (*CTSB*, *PRPF3*).

Figure 5 Enlarged 2-DE gels of proteins from conditioned medium-treated Hep-2 cells and stromal fibroblasts. Five proteins (arrows), tubulin beta (A-B), alpha enolase (C-D), aldolase A (E-F), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G-H) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (I-J) were down-regulated in Hep-2 cell line treated with fibroblast conditioned medium (A, C, E, G and I) and two proteins (K-L), vimentin (arrow on left) and actin (arrow on right), were underexpressed in fibroblasts treated with Hep-2 cell line conditioned medium (K).

Two genes exhibited similar patterns in both cells (*RPLP0*, *TPT1*), which may indicate that the transcript levels are affected by soluble paracrine factors produced by either fibroblasts or neoplastic cells or by other *in vitro* conditions. Therefore, they may not be specific to interactions between stroma and tumor.

After literature analysis, nine genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *GPNMB*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*, *PRDX1* and *DAP3*) showing potential involvement in signaling cascades related to tumorigenesis and/or stromal/tumor cell interactions were selected for validation by real-time RT-PCR using treated and non-treated cell lines. For six genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*), the results were consistent with the RASH data. In almost half of the primary tumors analyzed, *ARID4A* transcripts also showed down-regulation, although no correlation with clinicopathological features was detected. These findings in primary tumors should reflect the complex network of a multi-cellular tissue, a situation contrasting with that of a neoplastic cell line cultured in medium conditioned by fibroblasts.

The product of *ARID4A* - AT rich interactive domain 4A (RBP1-like) - also known as *RBP1* or *RBBP1* gene, interacts with the tumor suppressor retinoblastoma (pRB) and histone-modifying complexes, repressing promoters of specific genes [58]. Röhl et al. [59] detected several genes, including *ARID4A*, overexpressed in astrocytes treated with medium conditioned by activated microglia, which protected them against stress conditions. Recently, Wu et al. [60] showed that *Arid4a*-deficient mice exhibit down-regulation of several homeobox genes and of the forkhead box gene *Foxp3*, which codes a transcription factor involved in the development and function of regulatory T cells [61]. These mice also show bone marrow failure with myelofibrosis and higher frequencies of hematologic malignancies, providing evidence that *ARID4A* functions as a tumor suppressor gene and its absence is permissive for the proliferation of connective tissue elements. The study of Perez et al. [62] added data on the role of this gene in cancer. These authors detected increased mRNA levels of *ARID4A* and *RBI* in normal human epidermal keratinocytes treated with arsenic and benzo [a]pyrene *in vitro*. Since these chemicals alter proliferation and inhibit differentiation of keratinocytes [63-65], the findings may indicate that up-regulation of *ARID4A* is negatively related to epithelial differentiation. Therefore, the potential modulation of this gene by paracrine factors produced by stromal fibroblasts may represent an attempt to promote differentiation of neoplastic epithelial cells and, at the same time, their proliferation.

Calreticulin (coded by *CALR* or *CRT* gene) is a calcium-binding protein of the endoplasmic reticulum with intracellular and extracellular functions related to

cellular adhesion, migration, and phagocytosis [66]. Calreticulin can be observed on the surface of stressed cells and, when bound to the plasma membrane of apoptotic cells, drives the phagocytosis by macrophages and dendritic cells [67]. In absence of this protein, the cells are not efficiently removed by phagocytes [68]. Recently, Nanney et al. [69] showed that calreticulin stimulates both migration and proliferation of keratinocytes and fibroblasts and apparently attracts monocytes and macrophages, suggesting its involvement in inflammatory response. Otherwise, fibroblasts underexpressing *CALR* exhibit weak adhesion and spreading [70]. Accordingly, Kypreou et al. [71] detected a correlation between calreticulin up-regulation and progression of fibrosis and also that TGF-beta, a contributing factor in fibrotic processes, up-regulated calreticulin in cultured human epithelial cells. In light of the data, we speculate that the low levels of this protein observed in treated Hep-2 cells inhibit proliferation, or represent a protective response of neoplastic cells to phagocytosis and antitumor immune process.

Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 or Rack1 (coded by *GNB2L1* gene) is a cytosolic protein homologous to the beta subunit of G proteins, and contains seven WD repeats, which act as sites for protein-protein interactions. Binding partners of *GNB2L1* include protein kinase C, Src family kinases, components of the ERK pathway, cytokine and interferon receptors, beta integrins and many others. Many of these interactions are consistent with the participation of Rack1 in cell adhesion, movement and growth [72-75].

Sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62 (coded by *SQSTM1* or *p60* or *p62* gene) is a 62-kDa protein that binds to the Src homology 2 (SH2) domain of p56^{lck} kinase in a phosphotyrosine-independent manner [76]. It has been suggested that p62 is a signaling adaptor which links different signal transduction pathways related to cell proliferation, differentiation and death, including NF- κ B pathway [77-82]. *SQSTM1* abnormal expression has been observed in hepatocellular, prostate and breast cancers [83-85] and is associated with poor outcomes in breast cancer [86].

Another gene down-regulated by fibroblast-conditioned medium is *USP9X* (ubiquitin specific peptidase 9, X-linked), also known as *DFFRX*, *FAF* or *FAM*. This gene is a member of the peptidase C19 family and encodes a protein similar to ubiquitin-specific proteases (USPs). These proteases regulate the production and recycling of ubiquitin and are critically involved in the control of cell growth, differentiation, and apoptosis [87]. Alteration of USPs may play an important role in the pathogenesis of cancer [88] and may exert distinct growth regulatory activities by acting as oncoproteins or

tumor suppressor proteins. Overexpression of certain USPs correlates with progression towards a more malignant phenotype in carcinoma of lung, kidney, breast and prostate [89,90].

RNF10 (ring finger protein 10) is the least known gene selected for validation. The product contains a ring finger motif, which is involved in protein-protein interactions and has been described in proteins implicated in many cellular processes such as signal transduction, transcriptional regulation, ubiquitination, and apoptosis [91,92].

With respect to proteomic analysis, few differences (mostly quantitative) between treated and non-treated cells were detected. Among the proteins differentially expressed, alpha-enolase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C C1/C2, aldolase A, tubulin beta and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were down-regulated in neoplastic cells treated with FCM and vimentin and actin were down-regulated in fibroblasts treated with HCM. These proteins, produced by neoplastic cells or fibroblasts, may affect tumorigenesis. For example, the glycolytic enzyme alpha-enolase and its enzymatically inactive isoform MBP-1 (c-myc promoter binding protein 1) are negative regulators for *MYC* expression [93,94]. *MYC* is one of the most frequently de-regulated oncogenes in cancer [95] and, in the absence of both enzymes, may become activated and accelerate tumor growth. Contrary to RaSH results, alpha enolase protein was observed underexpressed by proteomic analysis in treated Hep-2 cells, which may indicate a nonspecific finding or a post-transcriptional/posttranslational regulation of the RNA/enzyme.

Conclusions

Fibroblasts, as other cells in tumor microenvironments, need to maintain close communication with cancer cells, promoting proliferation, recruitment of inflammatory cells and acquisition of invasive characteristics. Similarly, cancer cells may influence stromal cells to generate a favorable and supportive environment, which would supply them with nutrients and factors necessary for developing the tumor and spreading of metastasis. In the present study, we observed both positive and negative effects exerted by fibroblasts on Hep-2 cells, favoring or not the former. A significant and common denominator in the results was the potential induction of signaling changes associated with immune or inflammatory response in the absence of a specific protein. In fact, *ARID4A* down-regulation is related to low levels of the transcript factor Foxp3 [60], which in turn is linked to immune responsiveness by targeting NF- κ B and CREB pathways [96]. The final effect is the inhibition of the inflammatory response and the cost is a permissive sign for fibroblast proliferation [60]. Down-regulation of

CARL also blocks the inflammatory response but has negative effects on stroma growth [69]. In presence of low levels of Rack1, again a deficient or altered inflammatory response may occur since Rack1 underexpression has already been related to the deregulation of cytokine production [97]. Similar results have been observed in p62-deficient mice, which exhibit abnormal control of NF- κ B activation and reduced inflammation in experimental conditions [98]. The opposite effect is expected for osteoactivin underexpression because this protein has been observed as a negative regulator of macrophage inflammatory responses [99].

The complexity of the tumor microenvironment is immense and much information is still necessary for better understanding how the relationship between stroma and carcinoma cells can be used for diagnostic and prognostic evaluation and a target for therapy.

Additional file 1: Clinicopathological features of 24 patients with larynx SCC and of 23 patients with tongue SCC.

Additional file 2: Underexpressed proteins in Hep-2 cells and fibroblasts treated with conditioned medium from fibroblasts (FCM) and Hep-2 (HCM), respectively.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (Grants 04/12054-9 and 06/60162-0), Rede Proteoma do Estado de São Paulo (Grant FAPESP 04/14846-0/FINEP 01.07.0290.00), The Ludwig Institute for Cancer Research, and the researcher fellowships from FAPESP (FCR-L) and Conselho Nacional de Pesquisas/CNPq (EHT, SMO).

The GENCAPO (Head and Neck Genome) Project authors are the following: Cury PM⁷, de Carvalho MB⁸, Dias-Neto E^{3,14}, Figueiredo DLA⁹, Fukuyama EE⁵, Góis-Filho JF⁵, Leopoldino AM¹⁵, Mamede RCM⁴, Michaluart-Junior P⁶, Moyses RA⁶, Nóbrega FG⁴, Nóbrega MP⁴, Nunes FD¹³, Ojopi EPB³, Serafini LN¹⁰, Severino P¹, Silva AMA⁸, Silva Jr WA¹¹, Silveira NJF¹⁶, Souza SCOM¹³, Tajara EH², Wünsch-Filho V¹², Amar A⁸, Bandeira CM⁴, Braconi MA⁴, Brandão LG⁹, Brandão RM¹¹, Canto AL⁴, Cerione M², Cicco R², Chagas MJ⁴, Chedid H⁸, Costa A¹², Cunha BR², Curioni OA⁸, Fortes CS¹², Franzi SA⁸, Frizzera APZ⁷, Gazito D⁸, Guimarães PEM⁶, Kaneto CM¹¹, López RVM¹², Macarenco R⁴, Magalhães MR⁸, Meneses C⁴, Mercante AMC⁸, Pinheiro DG¹¹, Polachini GM², Rapoport A⁸, Rodini CO¹³, Rodrigues-Lisoni FC², Rodrigues RV², Rossi L⁸, Santos ARD¹¹, Santos M⁸, Settani F⁵, Silva FAM¹⁵, Silva IT¹¹, Souza TB⁸, Stabenow E⁶, Takamori JT⁸, Valentim PJ⁵, Vidotto A², Xavier FCA¹³, Yamaguchi F⁵, Cominato ML⁵, Correa PMS⁴, Mendes GS⁵, Paiva R⁵, Ramos O⁶, Silva C⁸, Silva MJ², Tarlá MVC¹¹ (also presented in <http://ctc.fmp.usp.br/clinicalgenomics/cp/group.asp>).

Affiliations: ¹Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo; ²Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; ³Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo; ⁴Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, São Paulo; ⁵Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo; ⁶Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo; ⁷Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; ⁸Hospital Heliópolis, São Paulo; ⁹Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; ¹⁰Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; ¹¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; ¹²Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo; ¹³Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia da

USP, São Paulo; ¹⁴Centro de Pesquisas do Hospital AC Camargo, São Paulo, ¹⁵Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; ¹⁶Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, MG; Brazil.

Author details

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil. ²Department of Biology, Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil. ³Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil. ⁴Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil. ⁵Department of Head and Neck Surgery, Amalio Vieira de Carvalho Hospital, São Paulo, Brazil. ⁶Division of Head and Neck Surgery, Department of Surgery, School of Medicine (USP), São Paulo, Brazil. ⁷Department of Head and Neck Surgery, Heliópolis Hospital, São Paulo, Brazil. ⁸Department of Biology and Zootechny, Faculty of Engineering of Ilha Solteira (UNESP), Ilha Solteira, Brazil. ⁹Author list and addresses presented in the Acknowledgements.

Authors' contributions

FCR-L participated in the design of the study and analysis of the data, carried out cell culture, RaSH experiments and drafted the manuscript. PP Jr helped with RaSH experiments. AV and GMP carried out proteomics analysis. JMV was responsible for sample collection and processing. JC-R carried out cloning and sequencing of the samples. BRC carried out cell culture experiments. TH helped with manuscript preparation. CFS performed the real time PCR experiments. RAPT and SMO carried out immunofluorescence and immunohistochemical analysis. EEF and PM Jr carried out clinical data analysis for sample selection. MBdC carried out clinical data analysis for sample selection and drafted the manuscript. GENCAPO team members were responsible for sample collection and initial on-site sample processing, provided the pathological analysis of the cases, obtained the informed consent and discussed the findings. EHT participated in the study design and coordination, carried out the analysis and interpretation of the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 June 2009 Accepted: 4 May 2010 Published: 4 May 2010

References

- Kumar V FN, Abbas A: *Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Disease* Philadelphia: Saunders 2004.
- Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986, **315**(26):1650-1659.
- Tlsty TD, Hein PW: Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**(1):54-59.
- Li H, Fan X, Houghton J: Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007, **101**(4):805-815.
- Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM: Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol* 2007, **210**(1):111-121.
- Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, et al: Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008, **14**(5):518-527.
- Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW: Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res* 2007, **67**(9):4244-4253.
- Degen M, Brellier F, Kain R, Ruiz C, Terracciano L, Orend G, Chiquet-Ehrismann R: Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res* 2007, **67**(19):9169-9179.
- Micke P, Ostman A: Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004, **45**(Suppl 2):S163-175.
- Zalatnai A: Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* 2006, **6**(6):685-693.
- Kobayashi R, Deavers M, Patenia R, Rice-Stitt T, Halbe J, Gallardo S, Freedman RS: 14-3-3 zeta protein secreted by tumor associated monocytes/macrophages from ascites of epithelial ovarian cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009, **58**(2):247-258.
- Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D: Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 2008, **5**(1):e19.
- Mueller MM, Fusenig NE: Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(11):839-849.
- Quemener C, Gabison EE, Naimi B, Lescaille G, Bougatte F, Podgorniak MP, Labarche G, Lebbe C, Calvo F, Menashi S, et al: Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. *Cancer Res* 2007, **67**(1):9-15.
- Albini A, Sporn MB: The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(2):139-147.
- Maeda S, Omata M: Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci* 2008, **99**(5):836-842.
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D: Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 2000, **248**(3):171-183.
- Rodrigues-Lisoni FC, Mehet DK, Peitl P Jr, John CD, da Silva Junior WA, Tajara E, Buckingham JC, Solito E: In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. *FEBS Lett* 2006, **580**(5):1431-1438.
- Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni FC, Cury PM, Maniglia JV, Raposo LS, Tajara EH, Christian HC, Oliani SM: Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int J Cancer* 2007, **120**(12):2582-2589.
- Alves VA, Nonogaki S, Cury PM, Wunsch-Filho V, de Carvalho MB, Michaluart-Junior P, Moyses RA, Curioni OA, Figueiredo DL, Scapulatempo-Neto C, et al: Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2008, **53**(6):715-727.
- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A: Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**(1):3-10.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999, **59**(19):5002-5011.
- Orimo A, Weinberg RA: Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006, **5**(15):1597-1601.
- Elenbaas B, Weinberg RA: Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001, **264**(1):169-184.
- Hawsawi NM, Ghebeh H, Hendrayani SF, Tulbah A, Al-Eid M, Al-Tweigeri T, Ajarim D, Alaiya A, Dermime S, Aboussekhra A: Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res* 2008, **68**(8):2717-2725.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, Rijn van de M, Botstein D, Brown PO: Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**(20):12877-12882.
- Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(5):392-401.
- Eyden B: The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* 2008, **12**(1):22-37.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, et al: Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998, **94**(6):715-725.
- Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z: The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999, **98**(2):137-146.
- Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Briloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, et al: Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 2007, **171**(5):1608-1618.
- Bair EL, Massey CP, Tran NL, Borchers AH, Heimark RL, Cress AE, Bowden GT: Integrin- and cadherin-mediated induction of the matrix metalloproteinase matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001, **270**(2):259-267.

33. Ikebe T, Nakayama H, Shinohara M, Shirasuna K: **NF-kappaB involvement in tumor-stroma interaction of squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol* 2004, **40**(10):1048-1056.
34. Che ZM, Jung TH, Choi JH, Yoon do J, Jeong HJ, Lee EJ, Kim J: **Collagen-based co-culture for invasive study on cancer cells-fibroblasts interaction.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **346**(1):268-275.
35. Zhang W, Matrisian LM, Holmbeck K, Vick CC, Rosenthal EL: **Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo.** *BMC Cancer* 2006, **6**:52.
36. Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ: **Targeting the tumor microenvironment.** *Front Biosci* 2007, **12**:3468-3474.
37. Suresh S: **Biomechanics and biophysics of cancer cells.** *Acta Biomater* 2007, **3**(4):413-438.
38. Halsted KC, Bowen KB, Bond L, Luman SE, Jorcyk CL, Fyffe WE, Kronz JD, Oxford JT: **Collagen alpha1(XI) in normal and malignant breast tissue.** *Mod Pathol* 2008, **21**(10):1246-1254.
39. Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Dhungel B, Brown A, Weinberg AD: **OX40 agonist therapy enhances CD8 infiltration and decreases immune suppression in the tumor.** *Cancer Res* 2008, **68**(13):5206-5215.
40. Schneider BP, Sledge GW Jr: **Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer.** *Nat Clin Pract Oncol* 2007, **4**(3):181-189.
41. Gettinger S: **Targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer.** *Semin Respir Crit Care Med* 2008, **29**(3):291-301.
42. Aidinis V, Caminci P, Armaka M, Witke W, Harokopos V, Pavelka N, Koczan D, Argyropoulos C, Thwin MM, Moller S, *et al*: **Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis.** *PLoS Genet* 2005, **1**(4):e48.
43. Chen TR, Shaw MW: **Stable chromosome changes in human malignant melanoma.** *Cancer Res* 1973, **33**(9):2042-2047.
44. Miyamoto M, Sugawa H, Mori T, Hase K, Kuma K, Imura H: **Epidermal growth factor receptors on cultured neoplastic human thyroid cells and effects of epidermal growth factor and thyroid-stimulating hormone on their growth.** *Cancer Res* 1988, **48**(13):3652-3656.
45. Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M: **A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils.** *FASEB J* 2003, **17**(11):1544-1546.
46. Jiang H, Kang DC, Alexandre D, Fisher PB: **RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(23):12684-12689.
47. Sambrook J, Russell DW: **Molecular Cloning: a laboratory manual** Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 2001.
48. BLAST. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].
49. GeneOntology. [<http://www.geneontology.org>].
50. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
51. de Marqui AB, Vidotto A, Polachini GM, Bellato Cde M, Cabral H, Leopoldino AM, de Gois Filho JF, Fukuyama EE, Setanni FA, Cury PM, *et al*: **Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage.** *J Biochem Mol Biol* 2006, **39**(2):216-222.
52. MASCOT. [http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS].
53. UniProtKB/Swiss-Prot. [<http://caexpasy.org/sprot/>].
54. Ohtani H: **Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity.** *Tohoku J Exp Med* 1999, **187**(3):193-202.
55. De Wever O, Mareel M: **Role of tissue stroma in cancer cell invasion.** *J Pathol* 2003, **200**(4):429-447.
56. Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M: **Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma.** *J Clin Pathol* 2005, **58**(1):32-38.
57. Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, Frassica DA, DeSanto LW, O'Fallon WM, Hoverman VR: **Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994, **120**(12):1370-1374.
58. Hurst DR, Xie Y, Vaidya KS, Mehta A, Moore BP, Accavitti-Loper MA, Samant RS, Saxena R, Silveira AC, Welch DR: **Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(12):7438-7444.
59. Rohl C, Armbrust E, Kolbe K, Lucius R, Maser E, Venz S, Gulden M: **Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in Vitro.** *Glia* 2008, **56**(10):1114-1126.
60. Wu MY, Eldin KW, Beaudet AL: **Identification of chromatin remodeling genes Arid4a and Arid4b as leukemia suppressor genes.** *J Natl Cancer Inst* 2008, **100**(17):1247-1259.
61. Zheng Y, Rudensky AY: **Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage.** *Nat Immunol* 2007, **8**(5):457-462.
62. Perez DS, Handa RJ, Yang RS, Campain JA: **Gene expression changes associated with altered growth and differentiation in benzo[a]pyrene or arsenic exposed normal human epidermal keratinocytes.** *J Appl Toxicol* 2008, **28**(4):491-508.
63. Perez DS, Armstrong-Lea L, Fox MH, Yang RS, Campain JA: **Arsenic and benzo[a]pyrene differentially alter the capacity for differentiation and growth properties of primary human epidermal keratinocytes.** *Toxicol Sci* 2003, **76**(2):280-290.
64. Reznikova TV, Phillips MA, Rice RH: **Arsenite suppresses Notch1 signaling in human keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 2009, **129**(1):155-161.
65. Tse WP, Cheng CH, Che CT, Lin ZX: **Arsenic trioxide, arsenic pentoxide, and arsenic iodide inhibit human keratinocyte proliferation through the induction of apoptosis.** *J Pharmacol Exp Ther* 2008, **326**(2):388-394.
66. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P: **The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(3):122-129.
67. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, *et al*: **Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.** *Nat Med* 2007, **13**(1):54-61.
68. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM: **Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective.** *J Leukoc Biol* 2006, **79**(5):896-903.
69. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, *et al*: **Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects.** *Am J Pathol* 2008, **173**(3):610-630.
70. Szabo E, Papp S, Opas M: **Differential calreticulin expression affects focal contacts via the calmodulin/CaMK II pathway.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(1):269-277.
71. Kypreou KP, Kawadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, Psarras S, Capetanaki Y, Politis PK, Charonis AS: **Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis.** *Proteomics* 2008, **8**(12):2407-2419.
72. Vomastek T, Iwanicki MP, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ: **RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(23):8296-8305.
73. McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ: **The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms.** *Mol Pharmacol* 2002, **62**(6):1261-1273.
74. Doan AT, Huttenlocher A: **RACK1 regulates Src activity and modulates paxillin dynamics during cell migration.** *Exp Cell Res* 2007, **313**(12):2667-2679.
75. Mamidipudi V, Dhillon NK, Parman T, Miller LD, Lee KC, Cartwright CA: **RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints.** *Oncogene* 2007, **26**(20):2914-2924.
76. Joung I, Strominger JL, Shin J: **Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**(12):5991-5995.
77. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J: **The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis.** *Cancer Cell* 2008, **13**(4):343-354.
78. Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J: **The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation.** *EMBO J* 1999, **18**(11):3044-3053.
79. Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J: **The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway.** *EMBO J* 2000, **19**(7):1576-1586.
80. Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J: **The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor.** *J Biol Chem* 2001, **276**(11):7709-7712.

81. Mamidipudi V, Li X, Wooten MW: Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2002, **277**(31):28010-28018.
82. Chang S, Kim JH, Shin J: p62 forms a ternary complex with PKCzeta and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKCzeta inhibition. *FEBS Lett* 2002, **510**(1-2):57-61.
83. Stumpfner C, Heid H, Fuchsbichler A, Hauser H, Mischinger HJ, Zatloukal K, Denk H: Analysis of intracytoplasmic hyaline bodies in a hepatocellular carcinoma. Demonstration of p62 as major constituent. *Am J Pathol* 1999, **154**(6):1701-1710.
84. Thompson HG, Harris JW, Wold BJ, Lin F, Brody JP: p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* 2003, **22**(15):2322-2333.
85. Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Hisasue SI, Suzuki K, Tsukamoto T, Satoh M, Sato N: Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology* 2006, **48**(2):157-161.
86. Rolland P, Madjd Z, Durrant L, Ellis IO, Layfield R, Spendlove I: The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr Relat Cancer* 2007, **14**(1):73-80.
87. Rolen U, Kobzeva V, Gasparjan N, Ovaa H, Winberg G, Kisseljov F, Masucci MG: Activity profiling of deubiquitinating enzymes in cervical carcinoma biopsies and cell lines. *Mol Carcinog* 2006, **45**(4):260-269.
88. Dees EC, Orlowski RZ: Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer therapy. *Future Oncol* 2006, **2**(1):121-135.
89. Ovaa H, Kessler BM, Rolen U, Galaray PJ, Ploegh HL, Masucci MG: Activity-based ubiquitin-specific protease (USP) profiling of virus-infected and malignant human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**(8):2253-2258.
90. Deng S, Zhou H, Xiong R, Lu Y, Yan D, Xing T, Dong L, Tang E, Yang H: Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Treat* 2007, **104**(1):21-30.
91. Borden KL: RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 2000, **295**(5):1103-1112.
92. Freemont PS: RING for destruction? *Curr Biol* 2000, **10**(2):R84-87.
93. Spencer CA, Groudine M: Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991, **56**:1-48.
94. Subramanian A, Miller DM: Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 2000, **275**(8):5958-5965.
95. Prochownik EV: c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med* 2008, **8**(6):446-458.
96. Grant C, Oh U, Fugo K, Takenouchi N, Griffith C, Yao K, Newhook TE, Ratner L, Jacobson S: Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF-kappaB and CREB pathways. *PLoS Pathog* 2006, **2**(4):e33.
97. Racchi M, Sinforiani E, Govoni S, Marinovich M, Galli CL, Corsini E: RACK-1 expression and cytokine production in leukocytes obtained from AD patients. *Aging Clin Exp Res* 2006, **18**(2):153-157.
98. Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW: Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci* 2007, **32**(2):95-100.
99. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA: Gpnmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *J Immunol* 2007, **178**(10):6557-6566.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1755-8794/3/14/prepub>

doi:10.1186/1755-8794-3-14

Cite this article as: Rodrigues-Lisoni et al.: Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. *BMC Medical Genomics* 2010 **3**:14.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit