



## REVISÃO

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

Jucimara Colombo<sup>1</sup> e Paula Rahal<sup>2\*</sup>

Submetido em: 05 de junho de 2009 Recebido após revisão em: 05 de novembro de 2009 Aceito em: 20 de novembro de 2009

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1268>

**RESUMO:** A tecnologia de *microarray* é uma ferramenta de análise de expressão gênica que permite investigar a expressão de centenas ou milhares de genes em uma amostra com uma reação de hibridização. A tecnologia é baseada na hibridização de alvos marcados derivados de amostras biológicas e uma série de sondas de DNA imobilizadas em uma matriz sólida, que representam os genes de interesse. O estudo simultâneo de centenas de genes transformou a técnica de *microarray* em uma ferramenta de análise global muito importante, com aplicações em várias áreas, incluindo o estudo do desenvolvimento de neoplasias. O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) é o quinto tipo de câncer mais comum mundialmente, com uma incidência global anual de 780.000 novos casos. Estudos envolvendo *microarrays* têm identificado assinaturas de expressão gênica associadas a alterações em amostras de HNSCC em comparação com tecido normal, bem como genes envolvidos na evolução clínica e metástase. No entanto, há grande heterogeneidade entre estes estudos quanto ao delineamento, número de amostras, sítios e estágio da doença, escolha de plataforma e validação dos resultados. Assim, há muito a ser validado, antes que a técnica tenha utilidade clínica. Em relação ao câncer de cabeça e pescoço, a análise gênica em larga escala pode ser extremamente importante, uma vez que os métodos clínicos e histopatológicos utilizados atualmente parecem ser insuficientes para prever a evolução clínica e a resposta ao tratamento. Assim, esta abordagem pode resultar em diagnósticos e prognósticos mais efetivos e em terapias mais adequadas para esta neoplasia.

**Palavras-chave:** carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, expressão gênica, *microarray*.

**ABSTRACT:** (Microarray technology in study of head neck cancer). The microarray technology is a tool for global analysis of gene expression that allows investigating hundreds or thousands of genes in a sample using a hybridization reaction. This technology is based on hybridization between labeled targets derived from biological samples and an array of many DNA probes immobilized on a solid matrix, representing the genes of interest. The simultaneous study of hundreds of genes became the microarray technique a very important tool of global analysis, with applications in several areas, including the study of the development of cancer. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common cancer worldwide, with a global annual incidence of 780,000 new cases. Large-scale studies involving microarrays have identified specific gene expression signatures associated with expression changes in HNSCC samples compared to normal tissue, as well as genes involved in clinical outcome and metastasis. However, the considerable heterogeneity among these studies occurs due to experimental design, number of samples, disease sites and stage, choice of microarray platform and results validation. Thus, there is much to be validated, before the technique has clinical utility. In relation to head and neck neoplasia, the large-scale gene analysis is very important, since the clinical and histopathological methods currently used appear to be insufficient to predict clinical progression and response to treatment. Thus, this approach could result in more effective diagnostic and prognostic and most appropriate therapy for this neoplasia.

**Key words:** head and neck squamous cell carcinoma, gene expression, *microarray*.

## CONCEITOS

O fenótipo neoplásico é definido pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas que podem afetar modelos transcricionais e funções protéicas. Esses efeitos conferem vantagens competitivas para a célula, levando ao fenótipo maligno. Dessa forma, a análise global transcricional é uma importante ferramenta para revelar alguns destes mecanismos moleculares que levam a malignidade (Reis *et al.* 2005).

Duas tecnologias de análise global de expressão gênica têm sido bastante utilizadas atualmente: a análise seriada da expressão gênica (SAGE) e o *microarray*. Como consequência, o termo transcriptoma foi usado para definir o repertório de genes que são transcritos por uma célula ou um tecido, refletindo sua função, fenótipo ou respostas a estímulos ambientais (Brentani *et al.* 2005).

O desenvolvimento do chamado chip de DNA ou tecnologia de *microarray* permite investigar a expressão de centenas ou milhares de genes em uma dada amostra usando uma reação de hibridização. Dois termos são muito utilizados no desenvolvimento da técnica: sondas e alvos. As sondas são os fragmentos gênicos conhecidos que estão imobilizados em uma matriz sólida, ou seja, as sequências correspondentes aos genes de interesse; os alvos consistem nos cDNAs marcados que estão em solução, os quais são provenientes das amostras biológicas (Russo *et al.* 2003).

Dessa forma, um *array* pode ser definido como uma coleção ordenada de sondas, cada sonda representando uma única espécie de ácido nucleico e correspondendo ao gene de interesse. A tecnologia é baseada na hibridização entre sequências de cDNA alvos, derivadas das amostras

1. Doutora em Genética. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil

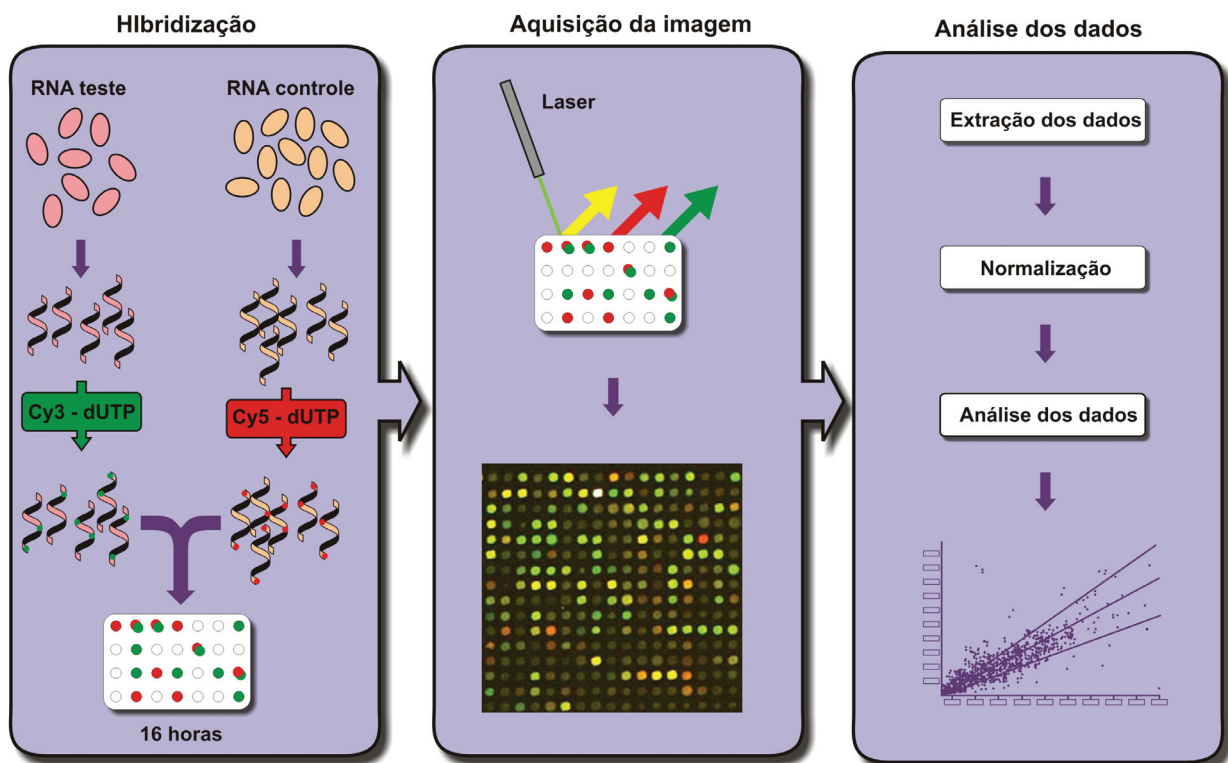
2. Livre-Docente em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: rahalp@yahoo.com.br

de interesse que são marcadas com fluoróforos ou radioisótopos, com um *array* de várias sondas de DNA, que estão imobilizadas em uma matriz sólida. Essa matriz pode ser uma lâmina de vidro ou sílica ou uma membrana de nylon. Os fluorocromos mais utilizados são *Cy3* (Cyanine 3) e *Cy5* (Cyanine 5), os quais apresentam características distintas, o que permite que duas amostras diferentes possam ser co-hibridizadas na matriz sólida. O sinal de hibridização produzido em cada sonda corresponde ao nível de expressão do respectivo gene em determinada amostra no momento do estudo. Dessa forma, após a hibridização competitiva dos alvos marcados, os sinais são detectados, quantificados, integrados e normalizados com *softwares* específicos e refletem o perfil de transcrição gênica para cada amostra biológica (Niemeyer & Blohm 1999, van de Rijn & Gilks 2004) (Fig. 1).

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

Ambas as modalidades de *microarray* apresentam vantagens e desvantagens (Marshall 2004). A principal vantagem dos oligos *array* é o controle de qualidade para as sequências imobilizadas. Esse controle ocorre durante a síntese, sendo desnecessário a verificação de performance da sequência, uma etapa que precisa ser realizada nos *arrays* de cDNA. Outra vantagem é que os oligos *array* podem ser usados para detecção de mutações e mapeamento gênico, permitindo a detecção diferencial de membros de família gênica ou transcritos alternativos, que não são distinguidos por cDNA *microarray* (Stillman & Tonkinson 2001). Como desvantagens, estão o custo mais elevado e a natureza dos oligos, pois, devido ao tamanho em geral, menor que 80 nucleotídeos, pode haver incerteza quanto a intensidade do sinal e a possibilidade de hibridização cruzada. Em relação à intensidade do sinal, é geralmente aceito que para o mesmo gene, sondas de cDNA maiores que 300 pares de bases fornecem sinais mais intensos do que sondas de oligos. Além disso, o maior tamanho das sondas de cDNA torna a hibridização mais estável permitindo o uso de condições mais estritas com o objetivo de reduzir sinais inespecíficos. Contudo, dados na literatura mostram um alto nível de concordância entre dados obtidos com oligo *arrays* e cDNA *arrays*, sendo que o problema relacionado com a hibridização cruzada pode ser minimizado por ferramentas de bioinformática (Hu-



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

ghes *et al.* 2001, Stillman & Tonkinson 2001).

Para os *arrays* de cDNA, é preciso definir um conjunto de parâmetros que são críticos para assegurar a reprodutibilidade do *chip*. Primeiramente, a sonda precisa ter menos que 85% de homologia em relação às demais. Ao mesmo tempo, o tamanho da sonda também é importante, uma vez que há uma correlação positiva entre tamanho de sonda e a intensidade do sinal. Dessa forma, sondas menores que 400 pares de base fornecem menos que 50% do sinal obtido com sondas de aproximadamente 600-2000 pares de bases (Brentani *et al.* 2005).

Devido a grande quantidade de dados gerados em um experimento de *array*, a análise da expressão gênica requer ferramentas estatísticas para identificar os genes diferencialmente expressos. Há dois métodos largamente aceitos de análises: a supervisionada e a não supervisionada. A análise não supervisionada examina os dados baseados somente no perfil de expressão gênica, desconsiderando características específicas do tecido em questão, ou seja, sem qualquer organização prévia. Esse tipo de análise permite a identificação de subtipos de tumores que não são distinguidos por características clínicas, radiográficas ou histológicas (Wu 2001, van de Rijn & Gilks 2004). Um exemplo de análise não supervisionada é a classificação molecular de carcinoma de células escamosas por clusterização hierárquica baseada em um conjunto de genes que identificou quatro subtipos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Chung *et al.* 2004).

A análise supervisionada seleciona os genes que são associados com parâmetros supervisionados ou com certas condições, tais como presença ou ausência de recorrência ou metástase. Nesse caso, a análise é dependente do parâmetro selecionado para discriminar os grupos com a maior capacidade de predição. Uma lista de genes preditores é gerada, a partir de um conjunto de genes que está sendo testado, os resultados são confirmados por análise cruzada *leave-one-out* e pela análise de uma amostra independente de pacientes (Wu 2001, van de Rijn & Gilks 2004, Statnikov *et al.* 2005).

Tanto a abordagem não-supervisionada quanto a supervisionada são comumente aplicadas ao mesmo conjunto de dados com distintos objetivos.

## APLICAÇÕES

Embora a base química do *microarray* não seja recente, o estudo simultâneo de centenas de genes transformou a técnica de *microarray* em uma ferramenta de análise global muito importante, com aplicações na biologia do desenvolvimento (Yoshida *et al.* 2009), classificação das doenças (Phan *et al.* 2004), estudos de vias metabólicas (Savli *et al.* 2008), descoberta de drogas (Chengalvala *et al.* 2007) e toxicologia (Ji *et al.* 2009).

A tecnologia de *array* permite identificar genes candidatos associados com o problema sob investigação e pode fornecer ferramentas de diagnóstico ou prognóstico, onde a identificação do gene não é um ponto crítico, mas

sim a informação quantitativa associada com o perfil ou assinatura de expressão (Brentani *et al.* 2005). Esta técnica pode ainda ajudar a determinar: i) os eventos moleculares responsáveis pela progressão das doenças, como por exemplo, de displasia a câncer e de carcinoma *in situ* a invasivo; ii) se há marcadores específicos ou perfis preditivos para a doença em questão; iii) se os perfis também predizem evolução como mortalidade; iv) modelos biológicos alterados e associá-los a novos alvos terapêuticos (Phan *et al.* 2004).

Em relação ao câncer, a proposta de usar *microarray* para o diagnóstico foi inicialmente sugerida por Khan *et al.* (1998), estudando uma amostra de rhabdomyosarcoma alveolar, reforçada pelo estudo de Golub *et al.* (1999), que distinguiram a leucemia mielóide aguda da leucemia linfocítica aguda pelo perfil de expressão gênica. Nesse trabalho, os perfis de expressão gênica mostraram-se muito informativos, possibilitando uma clara distinção entre os dois tipos de leucemia. Embora o diagnóstico histopatológico desses tipos de leucemia não seja difícil, o estudo serviu para demonstrar a eficiência das análises feitas com o perfil de expressão gênica de diferentes amostras. Ao que parece, essas podem ser muito úteis no diagnóstico diferencial em outros casos em que a análise histopatológica seja insuficiente para a classificação do tumor e avaliação da evolução da doença.

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

Dessa forma, as vantagens dessa técnica têm sido demonstradas em estudos realizados em uma extensa variedade de neoplasias, incluindo câncer de pulmão (Rohrbeck *et al.* 2008), estômago (Meireles *et al.* 2004), próstata (Reis *et al.* 2004), mama (Jansen *et al.* 2005), ovário (Lancaster *et al.* 2006), fígado (Lemmer *et al.* 2006), pâncreas (Nakamura *et al.* 2007), bem como câncer de cabeça e pescoço (Belbin *et al.* 2005).

## ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO PELA TÉCNICA DE MICROARRAY

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) constitui o quinto tipo de câncer mais comum, com uma incidência anual global de 780.000 novos casos (Sankaranarayanan *et al.* 1998). Os sítios comuns incluem cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, laringe e glândulas salivares (Canevari & Rogatto 2004, Döbrossy 2005).



O consumo de tabaco e/ou álcool são os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do HNSCC (Döbrossy 2005). Apesar dos recentes avanços no tratamento, o índice de sobrevivência dos pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem permanecido em 40%. A recidiva loco-regional e a metástase após terapia convencional parecem ser os principais fatores que contribuem para a sobrevivência reduzida dos pacientes (Thomas *et al.* 2005).

O desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço é um processo multipasso acompanhado por mudanças genéticas e epigenéticas, incluindo perda de heteroziguidade, inativação gênica por metilação e amplificação gênica (Lothaire *et al.* 2006, Choi & Myers 2008). Chang *et al.* (1998) reportaram pela primeira vez a aplicação da técnica de *microarray* na identificação de genes que sofrem alterações durante o desenvolvimento de câncer oral, o qual pertence ao grupo de câncer de cabeça e pescoço. Posteriormente, vários outros trabalhos também estudaram o perfil de expressão gênica em tumores de cabeça e pescoço, os quais encontraram alterações na expressão de genes envolvidos em diversos mecanismos celulares como controle do crescimento e diferenciação celular, angiogênese, apoptose, adesão e motilidade celular, remodelação tecidual, ciclo celular, sinalização, regulação da transcrição e sistema imune (Chung *et al.* 2006).

Alevizos *et al.* (2001) analisaram a expressão diferencial em tecido tumoral e normal de câncer de cabeça e pescoço, usando um *array* com sondas para 7.000 genes. Esses autores encontraram 600 genes associados com o desenvolvimento de câncer oral, incluindo oncogenes, genes supressores de tumor, genes que codificam para fatores transcricionais, enzimas metabolizadoras de xenobióticos e proteínas associadas a metástase. Sok *et al.* (2003) também compararam o perfil de expressão em nove amostras normais e tumorais de cabeça e pescoço utilizando um *array* de 12.000 genes, encontrando 227 genes diferencialmente expressos referentes a genes supressores de tumor, genes codificadores de quimioquinas, receptores de membrana e fatores de transcrição. Os autores destacaram o gene do colágeno tipo XI alpha 1, o qual estava expresso em todos os tumores e não foi detectado em tecido normal.

As diferenças no perfil de expressão entre amostras de tecido tumoral e normal de cabeça e pescoço também foram investigadas por estudos realizados por Somoza-Martin *et al.* (2005), Kainuma *et al.* (2006), Tomioka *et al.* (2006) e Colombo *et al.* (2009). No estudo realizado por Kainuma *et al.* (2006), os autores destacaram a superexpressão nos genes para metaloproteínas de matriz-1, 3 e 10; interleucina-8; caderina 3; bem como a baixa expressão nos genes para queratina 4 e 13. Tomioka *et al.* (2006) utilizaram uma plataforma de 16.617 genes para analisar a expressão gênica diferencial em nove amostras de carcinoma oral. Os autores observaram expressão alterada em 47 genes, envolvidos em adesão celular, apoptose, ciclo celular, crescimento,

metabolismo, transcrição e tradução de sinal.

Colombo *et al.* (2009) identificaram 35 genes diferencialmente expressos, dos quais 10 foram validados por PCR em tempo real. Os genes validados participam de processos celulares importantes como apoptose, ciclo celular, proteólise, inibição de proteases e regulação da transcrição. Entre os genes validados, destaca-se o gene *CSTB*, que tem atividade inibidora de protease de cisteína e, portanto, atividade anti-metastática, mostrando baixa expressão em todas as amostras de tumores analisadas.

González *et al.* (2003) estudaram a expressão gênica em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, como também em linhagens celulares. As diferenças encontradas *in vivo* foram testadas *in vitro* pela comparação com cultura de células normais e linhagem celular derivada de HNSCC. Os resultados foram validados por PCR e imuno-histoquímica, destacando-se nove genes, os quais mostraram marcante diferença de expressão entre tecido normal e tumoral: *ABCG1*, *CAGB*, *CD24*, *EHF*, *headpin*, *LEKTI*, *periostin*, *TGM3* e *ZNF-185*. Os genes *ABCG1*, *headpin*, *LEKTI*, *TGM3* e *ZNF-185* mostraram um perfil de expressão similar tanto nas linhagens quanto nas amostras.

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

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

Um modelo de progressão transcricional de carcinoma

de células escamosas de cabeça e pescoço foi proposto por Ha *et al.* (2003). Nesse estudo, os autores observaram que a maioria das alterações transcricionais foi encontrada antes do desenvolvimento do fenótipo maligno. A progressão de tecido normal a pré-maligno foi associada com expressão alterada de 334 genes, enquanto a progressão de pré-maligno a maligno foi associada com expressão alterada de 23 genes. As funções dos genes que estavam com alta expressão nas lesões malignas, quando comparadas com mucosa normal foram principalmente associadas com angiogênese, apoptose, adesão celular, ciclo celular, modulação de citocinas, regulação da transcrição e vias de sinalização celular. Dessa forma, de acordo com Ha *et al.* (2003), lesões pré-malignas de cabeça e pescoço possuem muitas das alterações encontradas em câncer antes do desenvolvimento de um fenótipo maligno, pois a maioria das alterações ocorre antes da expressão fenotípica da malignidade. Estudos realizados por Serewko *et al.* (2002), por sua vez, indicam que alterações em genes associados com matriz extra-celular e apoptose são alterados em fases iniciais da neoplasia, enquanto estágios posteriores estão associados com alterações em genes de reparo de DNA ou de fatores de crescimento.

Outros estudos sugerem que subtipos histológicos distintos exibem diferentes assinaturas de expressão gênica. Um estudo realizado por El-Naggar *et al.* (2002) comparou seis amostras de HNSCC com histologia convencional com seis subtipos histológicos menos comuns, conseguindo distingui-los pelo perfil de expressão gênica. Em outro estudo, Belbin *et al.* (2005) avaliaram os perfis de expressão de progressão tumoral em nove pacientes com estágio III e IV e identificaram 140 genes cuja expressão aumentou e 94 genes cuja expressão diminuiu durante a progressão de tecido normal a tumor invasivo e desse a metastático. Esse estudo avaliou tumores em estágio avançado e mostrou um modelo distinto de expressão, evidenciando alta expressão do gene que codifica a proteína moesina, que está envolvida na regulação da adesão celular, e baixa expressão de quatro potenciais genes supressores de tumor.

Análise de *microarray* também tem sido usada para identificar distintas assinaturas de expressão gênica associadas com evolução clínica. Dessa forma, Belbin *et al.* (2002) utilizaram uma plataforma com 9.216 clones e identificaram 375 genes diferencialmente expressos em HNSCC, os quais dividiam os pacientes estudados em dois subgrupos clinicamente distintos. Estes resultados demonstraram que o perfil de expressão pode ser usado como um preditor de evolução clínica.

Do mesmo modo, Chung *et al.* (2004) identificaram quatro subtipos distintos de HNSCC com diferentes evoluções clínicas baseados nos modelos de expressão obtidos de 60 amostras de HNSCC que exibiam diferenças significativas quanto ao índice de sobrevivência livre de recorrência. Esse estudo, bem como os trabalhos de Villaret *et al.* (2000), Hartmann *et al.* (2002), Nagata *et al.* (2003) e Kainuma *et al.* (2006) evidenciaram superexpressão das metaloproteinases de matriz, como MMP-1,

MMP-2, MMP-3 e MMP-9 em HNSCC, reforçando o seu papel nos mecanismos de invasão e metástase desse tipo de neoplasia.

Ginos *et al.* (2004) estudaram pacientes com HNSCC que apresentaram recorrência local e encontraram uma assinatura de expressão relacionada com genes envolvidos em invasão tumoral e metástase. Os autores verificaram que os tumores recorrentes estudados não apresentaram uma assinatura gênica relacionada com resposta imune, sugerindo que a modulação da resposta imune pode ter um papel na falha do tratamento. Chin *et al.* (2005), por sua vez, estudando o perfil de expressão de 13.000 genes em sete casos de câncer de cabeça e pescoço, identificaram 1.260 genes diferencialmente expressos. Dentre esses, os autores destacaram o gene da osteonectina como um marcador de prognóstico independente para intervalo livre de doença e sobrevivência global reduzidos. Também foi observada superexpressão dos genes *PAI-1* e *PLAU*, os quais estão envolvidos em indução de angiogênese e metástase.

Ma *et al.* (2009) coletaram células tumorais e normais de laringe por microdissecção a laser e compararam o seu perfil de expressão por *array*. Os autores encontraram 761 genes diferencialmente expressos ao compararem tumores de estágio inicial e avançado. A expressão anormal de alguns genes relevantes como *MMP12*, *HMG2*, e *TIMP4* foi validada por PCR em tempo real e imuno-histoquímica.

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

Roepman *et al.* (2005) encontraram um conjunto preditor de metástase composto por 102 genes, o qual foi baseado no perfil de expressão de 82 amostras de HNSCC de cavidade oral e orofaringe, sendo 45 metastáticas e 37 não metastáticas. Quando o conjunto preditor foi utilizado para agrupar 22 amostras independentes, o *status* de metástase em linfonos foi corretamente predito em 86,4% dos casos. Carinci *et al.* (2007) analisaram 19.200 genes, por *microarray*, e encontram 158 genes diferencialmente expressos nas amostras tumorais que apresentaram metástase em linfonodos quando comparadas às que não apresentavam. Entre os genes correlacionados com progressão metastática em linfonodos, os autores verificaram, *in vitro*, que o gene *NM23-H3* reduz a motilidade celular, e que o gene *TRIM8* refere-se a um gene supressor tumoral.

Roepman *et al.* (2006) também observaram que o perfil de expressão gênica em tumores primários de HNSCC é

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

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

#### LIMITAÇÕES ATUAIS E POSSIBILIDADES FUTURAS

Apesar da tecnologia de *microarray* representar uma ótima oportunidade para a pesquisa clínica, questões significativas precisam ser consideradas. Embora os estudos possam monitorar mudanças globais, os mesmos são limitados pelo acesso e custo. Há também a falta de padrões rigorosos para coleta dos dados, análise e validação (Russo *et al.* 2003).

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

Além disso, as amostras de tecido tumoral humano são uma mistura de diferentes tipos celulares, como células neoplásicas, estromais, inflamatórias, endoteliais e normais. Dessa forma, mudanças nos modelos de expressão gênica, quando se comparam duas diferentes amostras, é a manifestação de todos os tipos celulares presentes, o que pode, segundo alguns autores, ocasionar análises inadequadas. Métodos como microdissecação a laser, a qual permite o isolamento de células específicas, podem ser muito úteis, mas ainda são tecnologicamente limitados (Irié *et al.* 2004). No entanto, outros autores referem à importância da interação entre as células neoplásicas e seu estroma circunvizinho ou células não tumorais, pois a biologia do tumor é o resultado da interação desses vários tipos celulares e dessa forma, é relevante sua presença nas amostras sob investigação (Brentani *et al.* 2005).

O reduzido tamanho de muitas amostras clínicas é outro problema crítico, devido a pouca quantidade de RNA obtida, especialmente nos casos em que as amostras foram microdissecadas a laser. Uma solução para esse problema é amplificação de RNA, técnica que já vem sendo utilizada (Zhao *et al.* 2002, Zhu *et al.* 2006).

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

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

Outro ponto importante é quanto a validação dos resultados obtidos, pois os genes identificados como diferencialmente expressos pela técnica de *microarray* precisam ter sua expressão diferencial confirmada. No entanto, muitos trabalhos não realizaram tais validações, o que contribui para a heterogeneidade dos resultados. As técnicas que podem ser utilizadas para as validações dos dados gerados por *microarray* incluem, por exemplo, imuno-histoquímica, *tissue array* e PCR em tempo real (Chen *et al.* 2003, van de Rijn & Gilks 2004, Li *et al.* 2008).

A imuno-histoquímica é uma técnica que permite a localização de proteínas específicas no tecido sob investigação, por explorar o princípio de ligação antígeno-anticorpo. Embora seja atualmente uma técnica amplamente usada para o diagnóstico diferencial de neoplasias, ainda há necessidade de maior padronização nos procedimentos, para que os resultados sejam mais reprodutíveis em diferentes laboratórios (Werner *et al.* 2000, Giordano 2009).

A técnica de *tissue array* tem um enorme potencial para facilitar a transferência dos achados da pesquisa básica para a prática clínica (Hewitt 2009). Essa técnica permite a análise do perfil de expressão de proteínas em espécimes determinando seu potencial clínico e já foi empregada com sucesso para validação de marcadores de prognóstico em câncer de cabeça e pescoço (Chen *et al.* 2003, van de Rijn & Gilks 2004).

A técnica de PCR em tempo real foi desenvolvida recentemente para estudos envolvendo expressão gênica e trata-se de um método de análise que mede o acúmulo



dos produtos de PCR a medida que vão sendo produzidos, e dessa maneira, quantifica as cópias de mRNA dos genes estudados. Essa técnica tem recentemente alcançado um nível de sensibilidade, confiabilidade e praticidade que suporta seu uso como um bioinstrumento de rotina para quantificação de expressão gênica, sendo atualmente considerado o método mais apropriado para confirmar os dados gerados por *microarray* (Provenzano & Mocellin 2007).

## CONCLUSÕES

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

Em relação ao câncer de cabeça e pescoço, isso seria extremamente importante uma vez que os métodos clínicos e histopatológicos utilizados atualmente mostram-se insuficientes para prever a evolução clínica e a resposta ao tratamento nos pacientes. Tal abordagem poderá resultar em diagnósticos e prognósticos mais efetivos e em terapias mais adequadas para essa neoplasia, que permanece como um dos mais frequentes e desfigurantes tumores que afetam tanto a duração como a qualidade de vida.

## AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, Mânlio Tasso de Oliveira Mota, pela confecção da figura 1.

## REFERÊNCIAS

- AL MOUSTAFA, A., ALAOUJ-JAMALI M.A., BATIST, G., HERNANDEZ-PEREZ, M., SERRUYA, C., ALPERT, L., BLACK, M.J., SLADEK, R. & FOULKES, W.D. 2002. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 21: 2634-2640.
- ALEVIZOS, I., MAHADEVAPP, M., ZHANG, X., OHYAMA, H., KOHNO, Y., POSNER, M., GALLAGHER, G.T., VARVARES, M., COHEN, D., KIM, D., KENT, R., DONOFF, R.B., TODD, R., YUNG, C.M., WARRINGTON, J.A. & WONG, D.T. 2001. Oral cancer *in vivo* gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene*, 20: 696-6204.
- BELBIN, T. J., SINGH, B., BARBER, I., SOCCI, N., WENIG, B., SMITH, R., PRYSTOWSKY, M.B. & CHILDS, G. 2002. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using cDNA microarrays. *Cancer Res*, 62: 1189-1190.
- BELBIN, T. J., SINGH, B., SMITH, R.V., SOCCI, N.D., WREESMANN, V.B., SANCHEZ-CARBAYO, M., MASTERTSON, J., PATEL, S., CORDON-CARDO, C., PRYSTOWSKY, M.B. & CHILDS, G. 2005. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131: 10-18.
- BENITO, M., PARKER, J., DU, Q., WU, J., XIANG, D., PEROU, C.M. & MARRON, J.S. 2004. Adjustment of systematic microarray data biases. *Bioinformatics*, 20: 105-110.
- BRAAKHUIS, B. J., SENFT, A., DE BREE, R., DE VRIES, J., YLSTRA, B., CLOOS, J., KUIK, D.J., LEEMANS C.R. & BRAKENHOFF, R.H. 2006. Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*, 59: 1254-1260.
- BRENTANI, R. R., CARRARO, D.M., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., REIS, E.M., NEVES, E.J., DE SOUZA, S.J., CARVALHO, A.F., BRENTANI, H. & REIS, L.F. 2005. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 54: 95-105.
- CANEVARI, R. A. & ROGATTO, S.R. 2004. Câncer de cabeça e pescoço. In: FERREIRA, C. G.; CASALI, J.C.R., organizadores. *Oncologia Molecular*. 1º ed. São Paulo: Atheneu, 189-203.
- CARINCI, F., ARCELLI, D., LO MUZIO, L., FRANCIOSO, F., VALENTINI, D., EVANGELISTI, R., VOLINIA, S., D'ANGELO, A., MERONI, G., ZOLLO, M., PASTORE, A., IONNA, F., MASTRANGELO, F., CONTI, P. & TETÈ, S. 2007. Molecular classification of nodal metastasis in primary larynx squamous cell carcinoma. *Transl Res*, 150: 233-245.
- CHANG, D.D., PARK, N.H., DENNY, C.T., NELSON, S.F. & PE M. 1998. Characterization of transformation related genes in oral cancer cell. *Oncogene*, 16: 1921-1930.
- CHEN, B., Van Den BREKEL, M.W., BUSCHERS, W., BALM, A.J. & VAN VELTHUYSEN M.L. 2003. Validation of tissue array technology in head and neck squamous carcinoma. *Head Neck*, 25: 920-930.
- CHENGALVALA, M.V., CHENNATHUKUZZHI, V.M., JOHNSTON, D.S., STEVIS, P.E. & KOPF, G.S. 2007. Gene expression profiling and its practice in drug development. *Curr Genomics*, 4: 262-270.
- CHIN, D., BOYLE, G.M., WILLIAMS, R.M., FERGUSON, K., PANDEYA, N., PEDLEY, J., CAMPBELL, C.M., THEILE, D.R., PARSONS, P.G. & COMAN, W.B. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. 2005. *Int J Cancer*, 113: 789-797.
- CHOI, P. & CHEN, C. 2005. Genetic expression profiles and biology pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 104: 1113-1128.
- CHOI, S. & MYERS, J.N. 2008. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res*, 87: 14-32, 2008. Review. Erratum in: *J Dent Res*, 87: 191.
- CHUNG, C. H., PARKER, J.S., KARACA, G., WU, J., FUNKHOUSER, W.K., MOORE, D., BUTTERFOSS, D., XIANG, D., ZANATION, A., YIN, X., SHOCKLEY, W.W., WEISSLER, M.C., DRESSLER, L.G., SHORES, C.G., YARBROUGH, W.G. & PEROU, C.M. 2004. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*, 5: 489-499.
- CHUNG, C. H., LEVY, S. & YARBROUGH, W.G. 2006. Clinical applications of genomics in head and neck cancer. *Head Neck*, 28: 360-368.
- COLOMBO, J., FACHEL, A.A., DE FREITAS CALMON, M., CURY, P.M., FUKUYAMA, E.E., TAJARA, E.H., CORDEIRO, J.A., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., REIS, E.M. & RAHAL, P. 2009. Expression profiling reveals molecular marker candidates of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 21: 649-663.
- DÖBROSSY, L. 2005. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*, 24: 9-17.
- DYSVIK, B., VASSTRAND, E.N., LOVLIE, R., ELGINDI, O.A., KROSS, K.W., AARSTAD, H.J., JOHANNESSEN, A.C., JONASSEN, I. & IBRAHIM, S.O. 2006. Gene expression profiles of head and neck carcinomas from Sudanese and Norwegian patients reveal common biological pathways regardless of race and lifestyle. *Clin Cancer Res*, 12: 1109-1120.
- EL-NAGGAR, A.K., KIM, H.W., CLAYMAN, G.L., COOMBES, M.M., LE, B., LAI, S., ZHAN, F., LUNA, M.A., HONG, W.K. & LEE, J.J. 2002. Differential expression profiling of head and neck squamous carcinoma: significance in their phenotypic and biological classification. *Oncogene*, 21: 8206-8219.
- GINOS, M.A., PAGE, G.P., MICHALOWICZ, B.S., PATEL, K.J., VO-

- LKER, S.E., PAMBUCCIAN, S.E., ONDREY, F.G., ADAMS, G.L. & GAFFNEY, P.M. 2004. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Res*, 64: 55-63.
- GIORDANO, G. Value of immunohistochemistry in uterine pathology: Common and rare diagnostic dilemmas. 2009. *Pathol Res Pract*, 205: 663-676.
- GONZALEZ, H.E., GUJRATI, M., FREDERICK, M., HENDERSON, Y., ARUMUGAM, J., SPRING, P.W., MITSUDO, K., KIM, H.W. & CLAYMAN, G.L. 2003. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129: 754-759.
- GOLUB, T.R., SLONIM, D.K., TAMAYO, P., HUARD, C., GAASEN-BEEK, M., MESIROV, J.P., COLLIER, H., LOH, M.L., DOWNING, J.R., CALIGIURI, M.A., BLOOMFIELD, C.D. & LANDER, E.S. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537.
- HA, P.K., BENOIT, N.E., YOCHER, R., SCIUBBA, J., ZAHURAK, M., SIDRANSKY, D., PEVSNER, J., WESTRA, W.H. & CALIFANO, J. 2003. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 9: 3058-3064.
- HARTMANN, K.A., MODLICH, O., PRISACK, H.B., GERLACH, B. & BOJAR, H. 2002. Gene expression profiling of advanced head and neck squamous cell carcinomas and two squamous cell carcinomas cell lines under radio/chemotherapy using cDNA arrays. *Radiother Oncol*, 63: 309-320.
- HEWITT, S.M. 2009. Tissue microarray as a tool in the discovery and validation of tumor markers. *Methods Mol Biol*, 520: 151-161.
- HUANG, J., QI, R., QUACKENBUSH, J., DAUWAY, E., LAZARIDIS, E. & YEATMAN, T. Effects of ischemia on gene expression. 2001. *J Surg Res*, 99: 222-227.
- HUGHES, T. R., MAO, M., JONES, A.R., BURCHARD, J., MARTON, M.J., SHANNON, K.W., LEFKOWITZ, S.M., ZIMAN, M., SCHELTTER, J.M., MEYER, M.R., KOBAYASHI, S., DAVIS, C., DAI, H., HE, Y.D., STEPHANIANTS, S.B., CAVET, G., WALKER, W.L., WEST, A., COFFEY, E., SHOEMAKER, D.D., STOUGHTON, R., BLANCHARD, A.P., FRIEND, S.H. & LINSLEY, P.S. 2001. Expression profile using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*, 19: 342-347.
- IRIÉ, T., AIDA, T. & TACHIKAWA, T. 2004. Gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma using laser microdissection and cDNA microarray. *Med Electron Microsc*, 37: 89-96.
- JANSEN, M.P.H.M., FOEKENS, J.A., VAN STAVEREN, I.L., DIRKZ-WAGER-KIEL, M.M., RITSTIER, K., LOOK, M.P., MEIJER-VAN GELDER, M.E., SIEUWERTS, A.M., PORTINGEN, H., DORSSERS, L.C., KLIJN, J.G. & BERNIS, E.M. 2005. Molecular classification of tamoxifen resistant breast carcinomas by gene expression profile. *J Clin Oncol*, 23: 732-738.
- JEON, G.A., LEE, J.S., PATEL, V., GUTKIND, J.S., THORGEIRSSON, S.S., KIM, E.C., CHU, I.S., AMORNPHIMOLTHAM, P. & PARK, M.H. 2004. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 112: 249-258.
- JI, R.R., DE SILVA, H., JIN, Y., BRUCCOLERI, R.E., CAO, J., HE, A., HUANG, W., KAYNE, P.S., NEUHAUS, I.M., OTT, K.H., PENHALLOW, B., COCKETT, M.I., NEUBAUER, M.G., SIEMERS, N.O. & ROSS-MACDONALD, P. 2009. Transcriptional profiling of the dose response: a more powerful approach for characterizing drug activities. *PLoS Comput Biol*, 5:e1000512.
- KAINUMA, K., KATSUNO, S., HASHIMOTO, S., OGUCHI, T., SUZUKI, N., ASAMURA, K. & USAMI, S. 2006. Differences in the expression of genes between normal tissue and squamous cell carcinomas of head and neck using cancer-related gene cDNA microarray. *Acta Otolaryngol*, 126: 967-974.
- KHAN, J., SIMON, R., BITTNER, M., CHEN, Y., LEIGHTON, S.B., POHIDA, T., SMITH, P.D., JIANG, Y., GOODEN, G.C., TRENT, J.M. & MELTZER, P.S. 1998. Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res*, 58: 5009-5013.
- LANCASTER, J. M., DRESSMAN, H.K., CLARKE, J.P., SAYER, R.A., MARTINO, M.A., CRAGUN, J.M., HENRIOTT, A.H., GRAY, J., SUTPHEN, R., ELAHI, A., WHITAKER, R.S., WEST, M., MARKS, J.R., NEVINS, J.R. & BERCHUCK, A. 2006. Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. *Int J Gynecol Cancer*, 16: 1733-1745.
- LEMMER, E. R., FRIEDMAN, S.L. & LLOVET, J.M. 2006. Molecular diagnosis of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: the potential of gene expression profiling. *Semin Liver Dis*, 26: 373-384.
- LI, N., JIAN, X., HU, Y., XU, C., YAO, Z. & ZHONG, X. Discovery of novel biomarkers in oral submucous fibrosis by microarray analysis. 2008. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 2249-2259.
- LOTHAIRE, P., DE AZAMBUJA, E., DEQUANTER, D., LALAMI, Y., SOTIRIOU, C., ANDRY, G., CASTRO, G.JR. & AWADA, A. 2006. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck*, 28: 256-269.
- MA, L.J., TIAN, Y.Q., XIAO, J.Y., LI, W., ZHANG, H., ZHANG, X. & HUANG, D.H. 2009. Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Arch Med Res*, 40: 114-123.
- MARSHALL, E. 2004. Getting the noise out of gene arrays. *Science*, 306: 630-631.
- MEIRELES, S. I., CRISTO, E.B., CARVALHO, A.F., HIRATA, R. JR., PELOSOF, A., GOMES, L.I., MARTINS, W.K., BEGNAMI, M.D., ZITRON, C., MONTAGNINI, A.L., SOARES, F.A., NEVES, E.J. & REIS, L.F. 2004. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. *Cancer Res*, 64: 1255-1265.
- NAGATA, M., FUJITA, H., IDA, H., HOSHINA, H., INOUE, T., SEKI, Y., OHNISHI, M., OHYAMA, T., SHINGAKI, S., KAJI, M., SAKU, T. & TAKAGI, R. 2003. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer*, 106: 683-689.
- NAKAMURA, T., FIDLER, I.J. & COOMBES, K.R. 2007. Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment. *Cancer Res*, 67: 139-48.
- NIEMEYER, C.M. & BLOHM, D. DNA Microarrays. 1999. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38: 2865-2869.
- O'DONNELL, R.K., KUPFERMAN, M., WEI, S.J., SINGHAL, S., WEBER, R., O'MALLEY, B., CHENG, Y., PUTT, M., FELDMAN, M., ZIOBER, B. & MUSCHEL, R.J. 2005. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene*, 24: 1244-1251.
- PEREZ-DIEZ, A., MORGUN, A. & SHULZHENKO, N. 2007. Microarrays for cancer diagnosis and classification. *Adv Exp Med Biol*, 593: 74-85.
- PHAN, J., QUO, C.F. & WANG, M.D. 2004. Comparative study of microarray data for cancer research. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 4: 2960-2963.
- PROVENZANO, M. & MOCELLIN, S. 2007. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol*, 593: 66-73.
- REIS, E. M., NAKAYA, H.I., LOURO, R., CANAVEZ, F.C., FLATSCHART, A.V., ALMEIDA, G.T., EGIDIO, C.M., PAQUOLA, A.C., MACHADO, A.A., FESTA, F., YAMAMOTO, D., ALVARENGA, R., DA SILVA, C.C., BRITO, G.C., SIMON, S.D., MOREIRA-FILHO, C.A., LEITE, K.R., CAMARA-LOPES, L.H., CAMPOS, F.S., GIMBA, E., VIGNAL, G.M., EL-DORRY, H., SOGAYAR, M.C., BARCINSKI, M.A., DA SILVA, A.M. & VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2004. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*, 23: 6684-6692.
- REIS, E. M., OJOPI, E.P., ALBERTO, F.L., RAHAL, P., TSUKUMO, F., MANCINI, U.M., GUIMARÃES, G.S., THOMPSON, G.M., CAMACHO, C., MIRACCA, E., CARVALHO, A.L., MACHADO, A.A., PAQUOLA, A.C., CERUTTI, J.M., DA SILVA, A.M., PEREIRA, G.G.,



- VALENTINI, S.R., NAGAI, M.A., KOWALSKI, L.P., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., TAJARA E.H., DIAS-NETO, E., BENGTSO, M.H., CANEVARI, R.A., CARAZZOLLE, M.F., COLIN, C., COSTA, F.F., COSTA, M.C., ESTÉCIO, M.R., ESTEVES, L.I., FEDERICO, M.H., GUIMARÃES, P.E., HACKEL, C., KIMURA, E.T., LEONI, S.G., MACIEL, R.M., MAISTRO, S., MANGONE, F.R., MASSIRER, K.B., MATSUO, S.E., NOBREGA, F.G., NÓBREGA, M.P., NUNES, D.N., NUNES, F., PANDOLFI, J.R., PARDINI, M.I., PASINI, F.S., PERES, T., RAINHO, C.A., DOS REIS, P.P., RODRIGUS-LISONI, F.C., RO-GATTO, S.R., DOS SANTOS, A., DOS SANTOS, P.C., SOGAYAR, M.C., ZANELLI, C.F. & HEAD AND NECK ANNOTATION CON-SORTIUM. 2005. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head and neck, and thyroid cancer. *Cancer Res*, 65: 1693-1699.
- ROEPMAN, P., WESSELS, L.F., KETTELARIJ, N., KEMMEREN, P., MILES, A.J., LIJNZAAD, P., TILANUS, M.G., KOOLE, R., HORDIJK, G.J., VAN DER VLIET, P.C., REINDERS, M.J., SLOOTWEG, P.J. & HOLSTEGE, F.C. 2005. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet*, 37: 182-186.
- ROEPMAN, P., DE JAGER, A., GROOT KOERKAMP, M.J., KUM-MER, J.A., SLOOTWEG, P.J. & HOLSTEGE, F.C. 2006. Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon lymph node metastasis. *Cancer Res*, 66: 11110-11114.
- ROHRBECK, A., DE JAGER, A., GROOT KOERKAMP, M.J., KUM-MER, J.A., SLOOTWEG, P.J. & HOLSTEGE, F.C. 2008. Gene expres-sion profiling for molecular distinction and characterization of laser cap-tured primary lung cancers. *J Transl Med*, 6: 1-17.
- RUSSO, G., ZEGAR, C. & GIORDANO, A. 2003. Advantages and limi-tations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*, 22: 6497-6507.
- SANKARANARAYANAN, R., MASUYER, E., SWAMINATHAN, R., FERLAY, J., WHELAN, S. 1998. Head and neck cancer: a global per-spective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res*, 18: 4779-486.
- SAVLI, H., SZENDRÖI, A., ROMICS, I. & NAGY, B. 2008. Gene net-work and canonical pathway analysis in prostate cancer: a microarray study. *Exp Mol Med*, 40: 176-185.
- SEREWKO, M.M., POPA, C., DAHLER, A.L., SMITH, L., STRUT-TON, G.M., COMAN, W., DICKER, A.J. & SAUNDERS, N.A. 2002. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carci-noma development. *Cancer Res*, 62: 3759-3765.
- SOK, J. C., KURIAKOSE, M.A., MAHAJAN, V.B., PEARLMAN, A.N., DELACURE, M.D. & CHEN, F.A. 2003. Tissue-specific gene ex-pression of head and neck squamous cell carcinoma in vivo by comple-mentary DNA microarray analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129: 760-770.
- SOMOZA-MARTÍN, J.M., GARCÍA-GARCÍA, A., BARROS-AN-GUEIRA, F., OTERO-REY, E., TORRES-ESPAÑOL, M., GÁNDARA-VILA P., REBOIRAS-LÓPEZ M.D., BLANCO-CARRIÓN, A. & GÁN-DARA-REY JM. 2005. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*, 63: 786-792.
- STATNIKOV, A., ALIFERIS, C.F., TSAMARDINOS, I., HARDIN, D. & LEVY, S. 2005. A comprehensive evaluation of multicategory clas-sification methods for microarray gene expression cancer diagnostic. *Bioinformatics*, 21: 631-643.
- STILLMAN, B.A. & TONKINSON, J. L. 2001. Expression microarray hybridization kinetics depend on length of the immobilized DNA but are independent of immobilization substrate. *Anal Biochem*, 295: 149-157.
- THOMAS, G. R., NADIMINTI, H. & REGALADO, J. 2005. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Path*, 8: 347-363.
- TOMIOKA, H., MORITA, K., HASEGAWA, S. & OMURA, K. 2006. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell car-cinoma. *J Oral Pathol Med*, 35: 206-211.
- van de RIJN, M. & GILKS, C.B. 2004. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology*, 44: 97-108.
- VILLARET, D.B., WANG, T., DILLON, D., XU, J., SIVAM, D., CHEEVER, M.A. & REED, S.G. 2000. Identification of genes overex-pressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngo-scope*, 110: 374-381.
- WERNER, M., CHOTT, A., FABIANO, A. & BATTIFORA, H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. 2000. *Am J Surg Pathol*, 24: 10016-1019.
- WU, T.D. 2001. Analysing gene expression data from DNA microarrays to identify candidate genes. *J Pathol*, 195: 53-65.
- YOSHIDA, T., MURATA, K., SHIRAKI, N., KUME, K. & KUME, S. Analysis of gene expressions of embryonic stem-derived Pdx1-expressing cells: implications of genes involved in pancreas differentiation. 2009. *Dev Growth Differ*, 51: 463-472.
- ZHAO, H., HASTIE, T., WHITFIELD, M.L., BORRESEN-DALE, A.L. & JEFFREY, S.S. 2002. Optimization and evaluation of T7 based RNA linear amplification protocols for cDNA microarray analysis. *BMG Genomics*, 3: 31.
- ZHU, B., XU, F. & BABA, Y. 2006. An evaluation of linear RNA ampli-fication in cDNA microarray gene expression analysis. *Mol Genet Metab*, 87: 71-79.