



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Julio de Mesquita Filho

Instituto de Biociências de Botucatu

MIRIAM MARANGON COELHO

**ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM TUMORES DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

**Botucatu - São Paulo
2009**

MIRIAM MARANGON COELHO

**ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM TUMORES
DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Botucatu - SP
2009

MIRIAM MARANGON COELHO

ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Regina Rogatto

Botucatu - SP
Dezembro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Coelho, Miriam Marangon.

Alterações genômicas em tumores de glândulas salivares / Miriam Marangon
Coelho. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências,
Botucatu, 2009.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Assunto CAPES: 20200005

1. Glândulas salivares - Câncer - Aspectos genéticos 2. Genética

CDD 616.316

CDD 575.1

Palavras-chave: Anormalidades cromossômicas; CGH; Marcadores moleculares;
Tumores de glândulas salivares



Dedicat6rias

A Deus...

“Eu pedi força... e Deus me deu dificuldades para superar e, assim me fortalecer.

Eu pedi sabedoria, conhecimento... e Deus me deu problemas para resolver.

Eu pedi prosperidade, solução para problemas materiais... e Deus me deu capacidade
para trabalhar.

Eu pedi saúde, cura... e Ele me deu forças, paciência, compreensão e esperança.

Eu pedi coragem, disposição... e Deus me deu perigos para enfrentar e superar.

Eu pedi favores, facilidades... e Deus me deu oportunidades.

Eu pedi carinho e amor... e Deus me deu pessoas com quem conviver.

Na minha oração eu não recebi nada do que pedi... mas sim tudo o que precisava!”

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

À Profª. Drª. Sílvia Regina Rogatto, minha orientadora, pelo imprescindível e valioso apoio em todas as fases de execução desta dissertação. A sua forma exigente, crítica e construtiva de argüir as idéias apresentadas, que direcionou este trabalho, facilitando o alcance de meus objetivos. E principalmente pela sua amizade, carinho e dedicação.

“...ensinar não é transferir conhecimentos, mas criar as possibilidades para a sua produção e a sua construção...”

(Paulo Freire, 1974, p. 24)

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), aos docentes do Departamento de Genética e ao Conselho de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu pela estrutura, ensino e formação de excelência.

Ao Hospital do Câncer A. C. Camargo - São Paulo, pela estrutura e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski e à Profª. Drª. Renata Coudry por colaborarem na obtenção das amostras e na obtenção dos dados clínicos e histopatológicos.

Às técnicas Eloísa e Louise pela extração de uma parte das amostras deste estudo e por todos os ensinamentos e ajuda.

Aos técnicos Severino e Sueli pela realização das imunohistoquímicas e por toda a atenção e ajuda.

À Dr. Maria Aparecida Custódio pela análise das imunohistoquímicas e por todo o apoio e carinho.

À Profª. Drª. Claudia Rainho pelos ensinamentos, sugestões e críticas na construção desta dissertação.

À equipe do Laboratório NeoGene: Rodrigo, Fabíola, Sandra, Cássia, Eliane, Priscila, Fernanda, Sara, Fábio, Luciana, Lívia, Rolando André, Francine, Ariane, Renata, Juan, Dra. Maria, Renee, Grazi e Rogério. E aos que já passaram pelo laboratório: Fabrício, Eloísa, Nádia, Carlos, Renata, Flávia, André, Camila, Haydee e Rodrigo. E também à agregada Sabrina. Pela ajuda, carinho e amizade de todos estes anos.

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! A alguns deles não procuro, basta saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida... mas é delicioso que eu saiba e sinta que eu os adoro, embora não declare e os procure sempre...”

(Vinícius de Moraes)

À Cássia Gisele Silveira pela companhia indescritível e por todos os bons momentos compartilhados. Pela paciência, força e apoio nas horas mais difíceis. E pela amizade verdadeira que levarei comigo para sempre.

Aos meus pais, Lúgia e Luiz Antônio, pela minha vida e formação moral. Pelo apoio em todas as minhas decisões e pelo incentivo para a concretização deste trabalho. E principalmente pelo amor incondicional e eterno.

Ao meu irmão, Luiz Antônio Júnior, pela paciência, pelas brigas, pelo apoio e por todo o carinho e amor.

Ao meu futuro esposo, Luiz Guilherme, pela compreensão em todos os momentos de separação, pelo apoio, companheirismo e principalmente pelo amor que me deu forças para concluir este trabalho.

Aos meus familiares, especialmente meus avós Zoraide e Genior (in memoriam), pelo exemplo de vida, carinho, respeito e admiração.

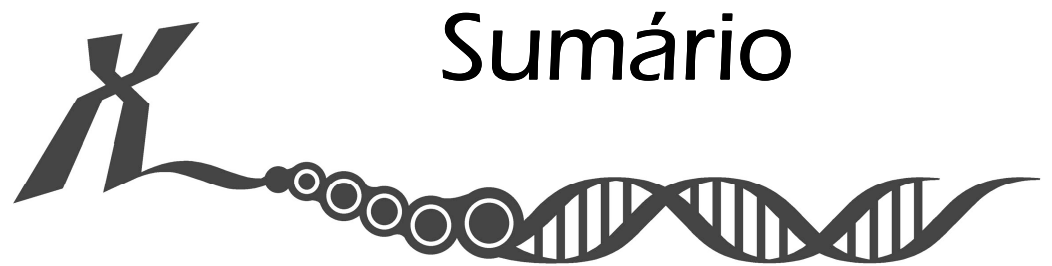
Às minhas amigas Nathalia, Rhani, Marcela e Carol pela amizade verdadeira conquistada e concretizada em anos de convivência.

Aos pacientes, objetivo maior da pesquisa científica, que esperam que frutos de trabalhos como este possam refletir em uma expectativa de vida melhor em um futuro próximo.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos que garantiu o apoio financeiro necessário à realização desta dissertação de mestrado.

À FAPESP pelos recursos financeiros destinados ao desenvolvimento deste projeto.

E a todos, que de uma forma ou de outra, participaram na realização deste projeto pessoal e profissional.



Sumário

Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	iii
Lista de Siglas e Abreviaturas	v
Resumo	x
Abstract	xi
I- Introdução	01
II- Justificativas	22
III- Objetivos	23
IV- Material e Métodos	24
1. Casuística.....	24
2. Métodos.....	25
2.1 Microdissecção dos espécimes.....	25
2.2 Extração do DNA.....	25
2.3 Hibridação Genômica Comparativa de Alta Resolução (<i>HR-CGH</i>).....	26
2.3.1 Marcação por <i>Nick Translation</i>	26
2.3.2 Marcação por <i>SCOMP (Single Cell Comparative Hybridization)</i>	27
2.3.3 Preparações cromossômicas.....	28
2.3.4 Condições de Hibridação e Tratamento Pós-Hibridação.....	29
2.3.5 Seleção e Captura de imagens.....	29
2.4 RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR em tempo real)	30
2.4.1. Extração de RNA total.....	30
2.4.2 Digestão do DNA e Transcrição reversa.....	32
2.4.3 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR).....	32
2.4.4 Análise Estatística.....	34
2.5 Imuno-histoquímica (IHQ).....	34
V- Resultados	35
1. Análise das alterações genômicas dos TGS.....	35
1.1 Adenomas Pleomórficos.....	38
1.2 Tumores de Warthin.....	43
1.3 Outros TGS.....	47

2. Seleção de genes candidatos.....	64
3. Análise de expressão dos transcritos <i>NEDD9</i> , <i>PPARG</i> e <i>c-MYC</i> em Adenomas Pleomórficos.....	65
4. Análise da expressão das proteínas CDH1 e HRK em Tumores de Warthin.....	74
VI- Discussão.....	79
VII- Conclusões.....	100
VIII- Referências Bibliográficas.....	101
Anexos.....	120

X Lista de Figuras

A decorative graphic element at the bottom of the page. It starts with a large, stylized 'X' shape on the left. A wavy line extends from the bottom of the 'X' to the right, passing through a series of five circles of varying sizes. The line then continues as a DNA double helix structure, ending with a wavy tail on the right.

Figura 1. Padrão de hibridação da amostra de tumor de Warthin (TW13). O DNA de amostras FFEP foi marcado pela metodologia de SCOMP.....	36
Figura 2. Padrão de hibridação da amostra de carcinoma adenóide cístico (CAC1F). O DNA das amostras a fresco foram marcadas pela metodologia de <i>nick translation</i>	37
Figura 3. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais freqüentes entre as 22 amostras parafinadas de AP (A) e entre as cinco amostras a fresco de AP (B) identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	41
Figura 4. Representação gráfica da freqüência de perdas e ganhos cromossômicos detectados por HR-CGH nas 27 amostras de AP analisadas.....	42
Figura 5. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais freqüentes entre as 11 amostras FFEP de tumores de Warthin identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	45
Figura 6. Representação gráfica da freqüência de perdas e ganhos cromossômicos nas 11 amostras de TW analisadas por HR-CGH.....	46
Figura 7. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais freqüentes entre as seis amostras FFEP de CXAP identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	49
Figura 8. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais freqüentes entre as cinco amostras a fresco de CAC identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$)..	53
Figura 9. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais freqüentes entre as quatro amostras a fresco de CME identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	55
Figura 10. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais freqüentes entre as três amostras a fresco de ACAR identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$)..	57
Figura 11. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas nas três amostras FFEP de CDS identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	59
Figura 12. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas nas duas amostras FPEP de ON identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	61
Figura 13. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas nas duas amostras parafinadas de CEM identificadas pela HR-CGH ($p<0,05$).....	63
Figura 14. Curvas de amplificação para os genes alvo NEDD9 (A), PPARG (B), c-MYC (C) e para o endógeno HPRT (D).....	66

Figura 15. Curvas de dissociação para os genes alvos NEDD9 (A), PPARG (B), c-MYC (C) e para o endógeno HPRT (D).....	67
Figura 16. Os valores de expressão dos transcritos NEDD9 (A), PPARG (B) e c-MYC (C) para os adenomas pleomórficos e normais (controles) estão apresentados em escala log e as barras indicam os valores da mediana.....	71
Figura 17. Análise imuno-histoquímica para a proteína CDH1 em tumores de Warthin.....	75
Figura 18. Análise imuno-histoquímica para a proteína HRK em tumores de Warthin.....	75

X Lista de Tabelas

A decorative graphic element at the bottom of the page. It features a large, stylized 'X' shape on the left, followed by a horizontal line of five circles of varying sizes, and then a DNA double helix structure extending to the right.

Tabela 1. Alterações genômicas freqüentemente observadas em TGS pela metodologia de CGH.....	08
Tabela 2. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos detectados entre as 27 amostras de adenomas pleomórficos (AP).....	39
Tabela 3. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as 11 amostras FFEP de tumores de Warthin (TW).....	44
Tabela 4. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as seis amostras FFEP de carcinomas ex-adenomas pleomórficos (CXAP).....	48
Tabela 5. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas em um caso de carcinoma adenóide cístico (CAC) em parafina e cinco amostras a fresco.....	51
Tabela 6. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as quatro amostras a fresco de carcinomas mucoepidermóides (CME).....	54
Tabela 7. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as três amostras a fresco de adenocarcinomas (ACAR).....	56
Tabela 8. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas nas três amostras FFEP de carcinomas ductais salivares (CDS).....	58
Tabela 9. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as duas amostras parafinadas de oncocitomas (ON).....	60
Tabela 10. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas nas duas amostras de carcinomas epiteliais mioepiteliais (CEM).....	62
Tabela 11. Resultados da avaliação da expressão por qRT-PCR em tempo real dos genes alvos <i>NEDD9</i> , <i>PPARG</i> e <i>c-MYC</i> e do endógeno <i>HPRT</i> em amostras de adenomas pleomórficos (AP) comparadas com amostras de tecidos normais de glândulas salivares..	68
Tabela 12. Perfil de expressão dos genes <i>NEDD9</i> , <i>PPARG</i> e <i>c-MYC</i> avaliados para as amostras de adenomas pleomórficos.....	70
Tabela 13. Análise comparativa entre as alterações genômicas detectadas em 6p24-p25, 3p25 e 8q24.21 e o padrão de expressão dos genes <i>NEDD9</i> , <i>PPARG</i> e <i>c-MYC</i> em seis amostras de adenomas pleomórficos.....	72
Tabela 14. Comparação entre o padrão de expressão dos transcritos <i>NEDD9</i> , <i>PPARG</i> e <i>c-MYC</i> e os dados clínico-patológicos dos adenomas pleomórficos analisados.....	73
Tabela 15. Comparação entre o padrão de expressão das proteínas CDH1 e HRK e os dados clínico-patológicos entre os tumores de Warthin analisados.....	77

Tabela 16. Comparação entre as alterações genômicas em 16q22.1 e 12q24.22 e o padrão de expressão das proteínas CDH1 e HRK em 11 amostras de tumores de Warthin..... 78

X Listas de Abreviaturas



Lista de Siglas e Abreviaturas

Geral

AB	Adenoma de célula basal
ACAR	Adenocarcinoma
ACCB	Adenocarcinoma de célula basal
AP	Adenoma pleomórfico
APM	Adenoma pleomórfico metastizante
CAC	Carcinoma adenóide cístico
CCECP	Carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço
CDS	Carcinoma ductal salivar
CEM	Carcinoma epitelial-mioepitelial
CME	Carcinoma mucoepidermóide
CNV	<i>Copy number variations</i> (Variações no número de cópias)
CXAP	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FFEP	Fixadas em formalina e em blocos de parafina
ON	Oncocitoma
RNA	Ácido ribonucléico
TGS	Tumores de glândulas salivares
TW	Tumor de Warthin

Metodologias

CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (Hibridação genômica comparativa)
CGH array (aCGH)	<i>Array-based Comparative genomic hybridization</i> (Hibridação genômica comparativa baseada em <i>microarrays</i>)
CISH	<i>Chromogenic in situ hybridization</i> (Hibridação cromogênica <i>in situ</i>)
COBRA-FISH	<i>Combined binary ratio-FISH</i> (Fluorescência de rotulagem combinada multicolor da relação binária)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Hibridação fluorescente <i>in situ</i>)
HR-CGH	<i>High Resolution Comparative genomic hybridization</i> (Hibridação genômica comparativa de alta resolução)
IHQ	Imuno-histoquímica
LOH	<i>Loss of heterozigose</i> (Perda de heterozigose)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real)
RNAi	RNA interference (RNA de interferência)
SCOMP	<i>Single Cell Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridação genômica comparativa de células únicas)
SKY	<i>Spectral karyotype</i> (Cariótipo espectral)

Genes

ACVRL1	<i>Activin A Receptor Type II-like 1</i>
ADAM-17	<i>ADAM metalloproteinase domain 17</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
AMAP1 (MYCBPAP)	<i>AMY1-associated protein 1; MYCBP associated protein</i>
ANAPC1	<i>Anaphase promoting complex subunit 1</i>

<i>ANGPT1</i>	<i>Angiopoietin 1</i>
<i>ANKRD32</i>	<i>Ankyrin repeat domain 32</i>
<i>APC</i>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<i>AQP5</i>	<i>Aquaporin 5</i>
<i>AXIN1</i>	<i>Axin 1</i>
<i>BAG1</i>	<i>BCL2-associated athanogene</i>
<i>BCL2L11</i>	<i>BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)</i>
<i>CADM2</i>	<i>Cell adhesion molecule 2</i>
<i>CAGE1</i>	<i>Cancer antigen 1</i>
<i>CASP14</i>	<i>Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
<i>CBP</i> (<i>CREBBP</i>)	<i>CREB binding protein</i>
<i>CCNB1</i>	<i>Cyclin B1</i>
<i>CD44</i>	<i>44 molecule (Indian blood group)</i>
<i>CD82</i>	<i>CD82 molecule</i>
<i>CDH1</i>	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
<i>CDH19</i>	<i>Cadherin 19, type 2</i>
<i>CDK4</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
<i>CDKN2A</i> (<i>TP16</i>)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)</i>
<i>CENPF</i>	<i>Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)</i>
<i>CHCHD7</i>	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7</i>
<i>c-MYC</i>	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
<i>CRISPLD2</i>	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2</i>
<i>CTAGE</i>	<i>Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 1</i>
<i>CTCF</i>	<i>CCCTC-binding factor (zinc finger protein)</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>
<i>DCC</i>	<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>
<i>DUSP6</i>	<i>Dual specificity phosphatase 6</i>
<i>EDA2R</i>	<i>Ectodysplasin A2 receptor</i>
<i>EDN1</i>	<i>Endothelin 1</i>
<i>EEF1A2</i>	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2</i>
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)</i>
<i>EPHA4</i>	<i>EPH receptor A4</i>
<i>ERBB3</i>	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)</i>
<i>ERBB4</i>	<i>v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)</i>
<i>ERK1</i>	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1</i>
<i>ETV6</i>	<i>Ets variant 6</i>
<i>FASN</i>	<i>Fatty acid synthase</i>
<i>FBXO4</i>	<i>F-box protein 4</i>
<i>FER</i>	<i>Fer (fps/fes related) tyrosine kinase</i>
<i>FEV</i>	<i>FEV (ETS oncogene family)</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<i>FGF2</i>	<i>Fibroblast growth factor- 2</i>
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor1</i>
<i>FGFR3</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor2</i>
<i>FGL2</i>	<i>Fibrinogen-like 2</i>
<i>FOXA1</i>	<i>Forkhead box A1</i>

<i>FOXF1</i>	<i>Forkhead box F1</i>
<i>GLI2</i>	<i>GLI family zinc finger 2</i>
<i>GREB1</i>	<i>Growth regulation by estrogen in breast cancer</i>
<i>HBEGF</i>	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
<i>HER2</i> (<i>ERBB2</i>)	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)</i>
<i>HMGIC</i> (<i>HMGA2</i>)	<i>High mobility group AT-hook 2</i>
<i>HNRNPK</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
<i>HOXC5</i>	<i>Homeobox C5</i>
<i>HPRT</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
<i>HRAS</i>	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>HRK</i>	<i>Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)</i>
<i>HTR1F</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F</i>
<i>HTRA2</i>	<i>HtrA serine peptidase 2</i>
<i>HUMARA</i> (<i>AR</i>)	<i>Androgen receptor</i>
<i>INHBA</i>	<i>Inhibin, beta A</i>
<i>ITGA1</i>	<i>integrin, alpha 1</i>
<i>JMJD2C</i> (<i>KDM4C</i>)	<i>Jumonji domain containing 2C; Lysine (K)-specific demethylase 4C</i>
<i>JUN</i>	<i>Jun oncogene</i>
<i>KISS1</i>	<i>KiSS-1 metastasis-suppressor</i>
<i>KLF5</i>	<i>Kruppel-like factor 5</i>
<i>KLF6</i>	<i>Kruppel-like factor 6</i>
<i>KLF12</i>	<i>Kruppel-like factor 12</i>
<i>KRAS</i>	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>KRT7</i>	<i>Keratin 7</i>
<i>KSR2</i>	<i>Kinase suppressor of ras 2</i>
<i>LAMA2</i>	<i>Laminin, alpha 2</i>
<i>LIFR</i>	<i>Leukemia inhibitory factor receptor alpha</i>
<i>LYN</i>	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>
<i>MADD</i>	<i>MAP-kinase activating death domain</i>
<i>MAD2L1</i>	<i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)</i>
<i>MAF</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)</i>
<i>MAML2</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)</i>
<i>MAPK</i>	<i>mitogen activated kinase-like protein</i>
<i>MDM2</i>	<i>Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)</i>
<i>MECT1</i> (<i>CRTC1</i>)	<i>Mucoepidermoid carcinoma translocated 1; CREB regulated transcription coactivator 1</i>
<i>MFHAS1</i>	<i>Malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1</i>
<i>MMP16</i>	<i>Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted) [</i>
<i>MVD</i>	<i>Mevalonate (diphospho) decarboxylase</i>
<i>NAT1</i> (<i>EIF4G2</i>)	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2</i>
<i>NDRG2</i>	<i>NDRG family member 2</i>
<i>NEDD8</i>	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>
<i>NEDD9</i>	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9</i>

<i>NEK3</i>	<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3</i>
<i>NF2</i>	<i>Neurofibromin 2 (merlin)</i>
<i>NM23</i> (<i>NME1</i>)	<i>Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in</i>
<i>NOR1</i> (<i>NR4A3</i>)	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>
<i>OAS1</i>	<i>2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa</i>
<i>OGG1</i>	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
<i>P2RX4</i>	<i>Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4</i>
<i>PDGF</i> (<i>PDGFB</i>)	<i>Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)</i>
<i>PDGFRB</i>	<i>Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>
<i>PHOX2B</i>	<i>Paired-like homeobox 2b</i>
<i>PIM3</i>	<i>Pim-3 oncogene</i>
<i>PLA2G16</i>	<i>Phospholipase A2, group XVI</i>
<i>PLAG1</i>	<i>Pleiomorphic adenoma gene 1</i>
<i>PNRC1</i>	<i>Proline-rich nuclear receptor coactivator</i>
<i>PPARG</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
<i>PRKACA</i>	<i>Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>
<i>PSMC6P</i>	<i>Proteasome 26S subunit, ATPase, 6 pseudogene 1</i>
<i>PTTG1</i>	<i>Pituitary tumor-transforming 1</i>
<i>PTTG3</i>	<i>Pituitary tumor-transforming 3</i>
<i>PYHIN1</i>	<i>Pyrin and HIN domain family, member 1</i>
<i>RAB13</i>	<i>RAB13, member RAS oncogene family</i>
<i>RAB2A</i>	<i>RAB2A, member RAS oncogene family</i>
<i>RAP1B</i>	<i>RAP1B, member of RAS oncogene family</i>
<i>RASEF</i>	<i>RAS and EF-hand domain containing</i>
<i>RASSF3</i>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3</i>
<i>RLNI</i>	<i>Relaxin 1</i>
<i>ROBO1</i>	<i>Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)</i>
<i>RUNX1T1</i>	<i>Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)</i>
<i>SARA</i> (<i>ZFYVE9</i>)	<i>Smad anchor for receptor activation; Zinc finger, FYVE domain containing 9</i>
<i>SEPT1</i>	<i>Septin 1</i>
<i>SH3KBP1</i>	<i>SH3-domain kinase binding protein 1</i>
<i>SKP2</i>	<i>S-phase kinase-associated protein 2 (p45)</i>
<i>SLC16A1</i>	<i>Solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)</i>
<i>SMAD4</i>	<i>SMAD family member 4</i>
<i>SMARCAD1</i>	<i>SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1</i>
<i>SNORD50A</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 50A</i>
<i>SEPT14</i>	<i>Septin 14</i>
<i>SUDS3</i>	<i>Suppressor of defective silencing 3 homolog (S. cerevisiae)</i>
<i>TACSTD2</i>	<i>Tumor-associated calcium signal transducer 2</i>
<i>TBL2</i>	<i>Transducin (beta)-like 2</i>
<i>TCEA1</i>	<i>Transcription elongation factor A (SII), 1</i>
<i>TCF-1</i> (<i>TCF7</i>)	<i>Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)</i>
<i>TERF1</i>	<i>Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1</i>

<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i>
<i>TGFB1</i> (<i>TGF-beta</i>)	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
<i>TGFBR1</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor 1</i>
<i>TGFBR2</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor 2</i>
<i>TIMP3</i>	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>
<i>TNFSF13</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13</i>
<i>TNK2</i>	<i>Tyrosine kinase, non-receptor, 2</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
<i>TP73L</i> (<i>TP63</i>)	<i>Tumor protein p73-like; tumor protein p63</i>
<i>TPD52</i>	<i>Tumor protein D52</i>
<i>TPR</i>	<i>Translocated promoter region (to activated MET oncogene)</i>
<i>TRIO</i>	<i>Triple functional domain (PTPRF interacting)</i>
<i>TRKT3 (TFG)</i>	<i>TRKT3 oncogene; TRK-fused gene</i>
<i>TSG101</i>	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
<i>TSP2</i> (<i>THBS2</i>)	<i>Thrombospondin 2</i>
<i>TSPAN7</i>	<i>Tetraspanin 7</i>
<i>TUSC1</i>	<i>Tumor suppressor candidate 1</i>
<i>TWIST1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>
<i>VEGFA</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
<i>VEGFB</i>	<i>Vascular endothelial growth factor B</i>
<i>VHL</i>	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
<i>WFDC1</i>	<i>WAP four-disulfide core domain 1</i>
<i>WIF1</i>	<i>WNT inhibitory factor 1</i>
<i>WNT1</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>
<i>WWOX</i>	<i>WW domain containing oxidoreductase</i>
<i>YB-1</i> (<i>YBX1</i>)	<i>Y box binding protein 1</i>
<i>ZNF10</i> (<i>KOX1</i>)	<i>Zinc finger protein 10</i>

Proteínas

<i>p63</i>	<i>Tumor protein p63</i>
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
<i>BCLXL</i>	<i>BCL2-like 1</i>
<i>CENP-E</i>	<i>Centromere protein E</i>
<i>TRAIL</i>	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand-like</i>



Os tumores de glândulas salivares (TGS) são lesões raras que apresentam heterogeneidade morfológica e sobreposição histológica entre os vários subtipos de tumores. Neste estudo foi utilizada a técnica de hibridação genômica comparativa de alta resolução (HR-CGH) em 64 amostras de TGS, incluindo: 27 adenomas pleomórficos (AP); 11 tumores de Warthin (TW); seis carcinomas ex-adenomas pleomórficos (CXAP); seis carcinomas adenóides císticos (CAC); quatro carcinomas mucoepidermóides (CME); três carcinomas ductais salivares (CDS); três adenocarcinomas (ACAR); dois oncocitomas (ON) e dois carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEM). Destas, 47 amostras eram provenientes de tecidos fixados em formalina e em blocos de parafina (FFEP) e 17 de tecidos a fresco. Após a microdissecção, o DNA genômico foi amplificado e marcado por técnica baseada na PCR (*SCOMP*) e por *nick translation*, respectivamente. Os cromossomos foram cariotipados usando a imagem DAPI invertido e a intensidade do sinal de hibridação foi determinada ao longo de cada cromossomo. Uma biblioteca com amostras de DNA normais foi construída para selecionar os limites superiores e inferiores para perdas e ganhos cromossômicos. Em todos os casos, as perdas genômicas foram observadas mais frequentemente do que os ganhos. Na análise comparativa das regiões mínimas comuns detectadas pela HR-CGH envolvendo todos os tipos tumorais, foram observadas alterações genômicas comuns aos diversos tipos, como também exclusivas para os diferentes tipos histológicos. As regiões genômicas consistentemente alteradas nos dois subgrupos tumorais com maior número amostral (adenomas pleomórficos e tumores de Warthin) foram investigadas em bancos de dados para a seleção de genes candidatos que pudessem estar relacionados com a etiologia destes tumores. Os genes *NEDD9* (6p24-p25), *PPARG* (3p25) e *c-MYC* (8q24.21) foram selecionados para a avaliação da expressão gênica quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em amostras de adenomas pleomórficos. Foi observado aumento do transcrito *NEDD9* em 17/37 casos de AP analisados; diminuição da expressão de *PPARG* em 11/36 casos e aumento de expressão do transcrito *c-MYC* em 24/28 casos; estes dados estavam em concordância com os achados da HR-CGH. Os níveis de expressão entre casos e controles foram significativamente diferentes para os genes *NEDD9* ($P < 0,0001$); *PPARG* ($P < 0,0001$) e *c-MYC* ($P = 0,0025$), sugerindo o envolvimento destes genes no desenvolvimento dos adenomas pleomórficos. Os genes *CDH1* (16q22.1) e *HRK* (12q24.22) foram selecionados para a análise da expressão protéica em amostras de tumores de Warthin. Na análise da proteína CDH1 nas células tumorais, 100% das amostras apresentaram marcação positiva de membrana e também tiveram mais de 1/3 da área marcada, não havendo concordância com os achados da HR-CGH. Na análise para a proteína HRK, 30% das amostras apresentaram ausência de marcação citoplasmática tanto em intensidade quanto extensão, em concordância com os achados da HR-CGH. Estes resultados sugerem o envolvimento do gene HRK no desenvolvimento dos tumores de Warthin. Os dados do presente estudo revelaram alterações genômicas consistentes entre os tumores de glândulas salivares evidenciando marcadores moleculares como o aumento de expressão do oncogene *c-MYC* em adenomas pleomórficos e perda da expressão da proteína HRK em tumores de Warthin.

Palavras-chave: Tumores de glândulas salivares; Anormalidades cromossômicas; CGH; Marcadores moleculares.



Abstract

Abstract

Salivary gland tumors (SGT) are uncommon lesions showing morphologic heterogeneity and histologic overlap among various tumoral subtypes. In the present study, high resolution-comparative genomic hybridization (HR-CGH) method was performed in 64 SGT samples, including 27 pleomorphic adenomas (PA), 11 Warthin's tumors (WT), six carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA), six cystic adenocarcinomas (CAC), four mucoepidermoid carcinomas (MEC), three salivary ductal carcinomas (SDC), three adenocarcinomas (ACAR), two oncocytomas (ON), and two epithelium-myoepithelium carcinomas (EMC). Among these samples, 47 were formalin-fixed and paraffin embedded tissues and 17 were fresh tissues. After laser capture microdissection (LCM), the DNA samples were amplified and labeled by PCR-based methods (SCOMP) and nick translation reaction, respectively. Chromosomes were karyotyped based on their inverted DAPI image and the relative hybridization signal intensity was determined along each chromosome. A library with differentially labeled normal samples was built to select the superior and inferior limits for chromosomal gains and losses. Genomic losses were more frequently observed than gains. The comparison among all tumor samples showed common chromosomal imbalances and also exclusive genomic alterations related to the different histological tumor types. Non-random genomic regions involved in pleomorphic adenomas and Warthin's tumors were investigated in databases in order to select candidate genes that could be related to the etiology of these tumors. The *NEDD9* (6p24-p25), *PPARG* (3p25) and *c-MYC* (8q24.21) genes were selected and the gene transcript levels were evaluated by quantitative real time PCR (qRT-PCR) in PA samples. In accordance to the HR-CGH results, it was observed high transcript levels of *NEDD9* in 17 out of 37 PA; low levels of *PPARG* was detected in 11 out of 36 samples; and high levels of *c-MYC* in 24 out of 28 cases. Statistically significant differences were observed between case and control samples for *NEDD9* ($P < 0.0001$); *PPARG* ($P < 0.0001$) e *c-MYC* ($P = 0.0025$) transcript levels. These results suggest that these genes are involved in the AP etiology. The protein expression of the *CDH1* (16q22.1) and *HRK* (12q24.22) genes were evaluated in WT. All tumor samples showed positive membrane staining for E-cadherin expression encoded by *CDH1* gene in at least 1/3 of tumoral areas, demonstrating no accordance to the HR-CGH data. In contrast, the protein analysis of *HRK* gene corroborates the HR-CGH findings since 30% of samples presented absence of cytoplasmic immunostaining. These results suggest that *HRK* gene is involved in WT development. In conclusion, the present study revealed consistent genomic imbalances in salivary gland tumors and putative molecular markers were described, such as *c-MYC* oncogene, that was up-expressed in PA, and *HRK* gene, whose protein expression was lost in WT samples.

Chain-Words: Salivary gland tumors; Chromosomal imbalances; CGH; Molecular markers



Introdução

Os tumores de glândulas salivares (TSG) são lesões raras e representam de 2 a 6,5% de todas as neoplasias da cabeça e pescoço. Estes tumores compõem um grupo com uma variedade de comportamentos biológicos e subtipos histológicos heterogêneos. Cerca de 90% destes tumores tem origem epitelial (Eveson e Calson, 1985). As neoplasias benignas são as mais comuns e ocorrem aproximadamente em 80% dos casos (Ito et al., 2005). A relação entre homens e mulheres é de 1:1, observando-se, no entanto, variações importantes em relação aos diferentes tipos histológicos. A idade média de aparecimento é de 45 anos, com pico entre a quinta e sexta décadas (Vargas et al., 2002). Clinicamente, os TGS se apresentam como tumores nodulares, de evolução lenta e assintomática, delimitados, e que se ulceram somente quando atingem grande volume (Ellis e Auclair, 1996).

Os tumores de glândulas salivares compreendem as glândulas salivares maiores e menores. A grande maioria está localizada nas parótidas, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos. Cinco a 10% são tumores localizados nas glândulas submandibulares, 1% ocorre nas sublinguais, 5 a 15% nas glândulas salivares menores e 5% acometem outros locais (Gates, 1982; Eveson e Cawson, 1985; Spiro, 1986; Ito et al., 2005). Quanto à incidência das neoplasias malignas por sítio anatômico, as glândulas sublinguais apresentam as maiores freqüências (80-90% dos casos). Nas glândulas menores esta porcentagem é de 40-85%, nas glândulas sublinguais 35-55% e nas parótidas 15-25% dos casos (Ellis e Auclair, 1996; Eveson e Cawson, 1985; Spiro, 1986; Satko et al., 2000; Ito et al., 2005).

O **adenoma pleomórfico** (AP) é a neoplasia de glândula salivar mais freqüente e o tumor benigno com maiores chances de sofrer transformação maligna entre os TGS (Waldron, 1991). É mais freqüente no sexo feminino, acometendo mulheres entre 30 e 50 anos de idade (Chidzonga et al. 1995; Bradley, 2005). Este tumor envolve as glândulas salivares maiores e menores, acometendo em torno de 60 a 70% de todas as neoplasias da parótida, 40 a 60% de tumores na glândula submandibular, 40 a 70% de tumores em glândulas salivares menores. A glândula sublingual é raramente afetada por esta neoplasia (Eveson e Cawson, 1985; Spiro, 1986; Chidzonga et al., 1995). Os AP são caracterizados macroscopicamente por uma cápsula fibrosa bem definida. Microscopicamente, apresentam uma cápsula incompleta de aparência polimórfica e com várias estruturas celulares. Histologicamente, esta neoplasia apresenta componentes epiteliais e estromais. O estroma neoplásico pode apresentar áreas fibrosas, hialinas, mixóides e cartilaginosas; sendo as células mioepiteliais responsáveis pela produção

destas matrizes extracelulares (Dardick et al., 1982; Palmer, 1985; Ponce-Bravo et al., 2007). Schreibstein et al. (1995) relataram a ocorrência de metástase muitos anos após múltiplas recorrências no sítio primário da lesão, sendo o quadro histológico, na maioria das vezes, idêntico ao das lesões primárias. O adenoma pleomórfico metastizante (APM) é distinto do verdadeiro adenocarcinoma e também do carcinoma ex-adenoma pleomórfico pela manutenção da aparência histológica benigna e por recorrerem no local da excisão incompleta do tumor ou por derramamento da matriz tumoral, quando ocorre ruptura da cápsula (Bradley, 2005). Ayoub et al. (2002) sugeriram que a ausência de cápsula aliada ao cresto infiltrativo da lesão possibilita a invasão de tecidos normais da glândula salivar. Além disso, o adenoma pleomórfico é uma das poucas neoplasias benignas que pode evoluir para transformação maligna, sendo o risco aumentado com o tempo de duração do tumor e com a idade do paciente (Waldron, 1991; Schreibstein et al., 1995), originando mais comumente o carcinoma epidermóide, mucoepidermóide e o ductal salivar (Nagao et al., 1981).

Os **oncocitomas** (ON) são um grupo raro de tumores que afetam principalmente a glândula parótida (80%), algumas vezes a glândula submandibular (9%) e raramente as glândulas salivares menores intra-orais. A incidência desta lesão representa aproximadamente 1% das neoplasias da parótida e é muito rara a apresentação bilateral (Stomeo et al., 2006). Macroscopicamente, os ON apresentam-se como uma massa avermelhada, firme e não cística. Histologicamente são compostos por células eosinofílicas granulares, amarronzadas e arredondadas, com pequenos núcleos denteados. Embora rara, é relatada degeneração maligna (Oh e Eisele, 2006). Os ON ocorrem mais freqüentemente em idosos (55 a 70 anos ao diagnóstico), com igual acometimento em ambos os sexos. Sua diferenciação histológica se faz pelo alto número de mitocôndrias, podendo ser confundido com outros tipos de TGS. Apesar de benignos, podem apresentar um potencial destrutivo, devendo ser tratado cirurgicamente (Ximenes-Filho et al., 2002).

O **tumor de Warthin** (TW) é o segundo tipo mais freqüente das neoplasias benignas da cabeça e pescoço que ocorre exclusivamente na glândula parótida ou nos linfonodos cervicais superiores. Os TW compreendem 4 a 11,2% de todos os tumores de glândulas salivares (Kotwall, 1992; Pinkston e Cole, 1996). Estas lesões podem ser multifocais ou bilaterais (Aguirre et al., 1998). Há relatos esporádicos de se apresentarem em região extraparotídeas e de ocorrer transformação maligna (Onder et al., 1990). Os TW são mais comuns em usuários de tabaco e acometem predominantemente o sexo masculino, sendo raramente relatado em negróides (Ximenes-Filho et al., 2002; Cardoso et al., 2008). Macroscopicamente, os tumores de Warthin são capsulados e apresentam espaços císticos,

preenchidos por um líquido viscoso de cor acastanhada (Castro et al., 2004). Histologicamente, são compostos por um componente epitelial que pode apresentar vilosidades papilares, cistos glandulares e/ou um padrão de desenvolvimento sólido. O epitélio contém um estroma linfóide composto por vários centros germinativos. Estudos baseados em amostras relativas destes dois componentes têm relatado subtipos histológicos associados ao desenvolvimento ou evolução desta lesão (Seifert et al., 1980; Rueo et al., 1987; Zarka, 2007). Há ainda vários questionamentos quanto à etiologia dos TW. Não se sabe, até o presente, se eles representam verdadeiros neoplasmas que surgem como proliferações clonais ou se representam malformações de desenvolvimento com uma origem não-neoplásica (Sobrinho-Simões e Máximo, 2006). Embora vários estudos moleculares tenham sido realizados até o presente, os resultados apresentados são conflitantes.

Entre as neoplasias malignas das glândulas salivares parece haver diferenças na incidência dependendo da população estudada. Nas séries avaliadas nos continentes americano e africano, o carcinoma mucoepidermóide foi o mais incidente, enquanto nas revisões realizadas no continente europeu, o carcinoma adenóide cístico se alternou com o carcinoma mucoepidermóide (Luukaa et al., 2005; Otho et al., 2005). Quando somente os TGS originados de glândulas salivares menores são estudados, o carcinoma mucoepidermóide apresenta-se como a lesão maligna mais comum e o palato como o principal sítio anatômico acometido (Loyola et al., 1995; Toida et al., 2005).

A baixa incidência dos diversos tipos de tumores malignos em glândulas salivares torna difícil estabelecer seu valor prognóstico. Entretanto, alguns fatores como tipo histológico, grau de diferenciação do tumor e local de origem podem influenciar significativamente o prognóstico (Spiro et al., 1973; Evans, 1984). Todavia, o estadió clínico é ainda considerado o fator mais importante (Spiro et al., 1978; Spiro et al., 1979; O' Brien et al., 1986).

Os tumores malignos mistos são classificados em três subtipos: (1) carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP), (2) tumores malignos mistos verdadeiros (carcinosarcomas), e (3) tumores mistos metastizantes. Os CXAP acometem a maioria destas neoplasias, enquanto tumores mistos malignos verdadeiros e tumores mistos metastizantes são extremamente raros (Lewis et al., 2001).

O **carcinoma ex-adenoma pleomórfico** acomete 3 a 5% de todos os TGS e 5 a 15% das neoplasias malignas destas glândulas. É uma neoplasia epitelial maligna que cresce no adenoma pleomórfico ou a partir dele (El-Naggar et al., 2000). Esta lesão freqüentemente apresenta metástases à distância e leva à morte do paciente dependendo do grau de

invasividade do tumor (Lewis et al., 2001). A incidência de transformação maligna aumenta com a duração do tumor, sendo de aproximadamente 2% para os tumores presentes há menos de cinco anos e de quase 10% para aqueles com mais de 15 anos de história da doença (Cotran et al., 2000). Estes tumores não têm predileção distintiva de sexo e são mais freqüentes na quinta e sexta década da vida (Olsen e Lewis, 2001). Devido à presença concomitante de componentes benignos e malignos, os CXAP representam um modelo único para a investigação de eventos genéticos relacionados à transformação maligna dos tumores de glândulas salivares (El-Naggar et al., 2000). A maioria dos CXAP é pobremente diferenciada dos adenocarcinomas, apresentando um curso clínico agressivo e pior prognóstico. Os CXAP são subclassificados em CXAP intracapsular, que é restrito a área do AP pré-existente; e CXAP extracapsular, que infiltra através dos confinamentos do AP. A distinção é de grande importância clínica porque o prognóstico dos CXAP intracapsular é favorável (Ihrler et al., 2007). Somente 18 casos de CXAP não-invasivos (intracapsular) foram relatados em literatura (Kunimura, 2007). Devido à raridade destes tumores, o conhecimento de marcadores para detecção clínica são poucos e inconclusivos (Gneep, 1993; El-Naggar et al., 1998).

O **carcinoma mucoepidermóide (CME)** é considerado o tumor epitelial maligno mais comum das glândulas salivares menores e maiores e representa um terço de todos os tumores de glândulas salivares malignos (Regezi et al., 1985; Ellis e Auclair, 1996). Este tumor se apresenta principalmente em mulheres na quinta década da vida; e é também a neoplasia de glândula salivar maligna mais freqüente em jovens (Healey et al., 1970). À macroscopia, apresenta-se como massa bem circunscrita, parcialmente encapsulada (Oh e Eisele, 2006). Histologicamente é composto por dois tipos de células, as mucosas e as epidermóides. A partir desta diferenciação podem ser divididos em baixo, intermediário e alto grau baseado na predominância de um ou outro tipo celular (Johns, 2007). O grau tumoral é um dos mais importantes fatores prognósticos em cinco anos: 92-100% nos de baixo grau, 62-92% nos de grau intermediário e de 0-43% nos de alto grau (Rahbar et al., 2006). O comportamento biológico do CME é muito variado, conseqüentemente, inúmeras classificações histológicas foram propostas na tentativa de caracterizar as variantes desse tipo de carcinoma (Batsakis e Luna, 1990). A maioria dos pacientes apresenta metástases regionais e recorrência e/ou metástases à distância (Auclair et al., 1992).

O **carcinoma adenóide cístico (CAC)** representa aproximadamente 20% dos tumores malignos de glândula salivar, sendo o tumor maligno mais freqüente da glândula submandibular (Camilleri et al., 1998). Este tumor se apresenta tipicamente na região da

cabeça e pescoço como uma massa assintomática e de crescimento lento. Uma pequena porcentagem dos pacientes apresenta dor e paralisia do nervo facial (Sykes et al., 1999). Alguns estudos relataram igual distribuição em relação ao sexo. No entanto, outros relatam ligeira predileção pelo sexo feminino. Essa neoplasia acomete mais frequentemente adultos na quinta a sétima década de vida, sendo raro em jovens (Ellis e Auclair, 1996). Macroscopicamente, trata-se de lesões geralmente pequenas, inadequadamente encapsuladas, infiltrativas e de cor rosa-acizentado (Cotran et al., 2000). Histologicamente, a maioria dos CAC exibe invasão perineural, um traço que explica a dificuldade de erradicação cirúrgica desta neoplasia (Hanna e Snen, 2001). Os tratamentos principais são a cirurgia e radioterapia, entretanto, muitos pacientes apresentam recorrência após vários anos de seguimento da terapia primária curativa. Destes, 40% desenvolvem metástases pulmonares após um período de 10 a 15 anos (Sessions et al., 2001). O prognóstico dos pacientes com CAC varia baseado no grau histológico do tumor. Os padrões incluem organização cribiforme, tubular e sólida. Tumores com predominância do componente sólido tendem a se comportar mais agressivamente que tumores com predominância histológica cribiforme ou tubular (Enamorado et al., 2004). A invasão perineural constitui um achado comum aos CAC, mas não pode ser considerado um fator patognomônico, pois também pode ser visto em outras neoplasias de glândulas salivares, como o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (Jones e Baiton, 1990; Alves et al., 2004).

O **carcinoma epitelial-mioepitelial** (CEM) é uma neoplasia típica da glândula parótida que apresenta componentes malignos ductais e mioepiteliais crescendo no adenoma pleomórfico. É relativamente pouco freqüente e representa menos de 1% das neoplasias malignas. É um tumor predominante em mulheres e com pico de incidência a partir dos 60 anos (Ellis e Auclair, 1996; Fonseca et al., 1997). Apesar da presença de características histológicas agressivas, a neoplasia é de baixo grau, recorre freqüentemente, mas raramente ocorrem metástases (Sheethala et al., 2007). Alguns estudos sugerem que os pacientes com CEM têm um maior risco de desenvolver um segundo tumor primário, tanto nas glândulas salivares como em outros sítios separados, como mama e tireóide (Ellis et al., 1991). Os componentes celulares dos CEM são polimórficos e incluem células fusiformes, epitelíoides, plasmocitíoides e células claras ou a combinação destas (Dardick et al., 1989). Foi proposto que estes quatro tipos celulares representam diferentes estágios da diferenciação de células mioepiteliais (Da Silveira et al., 2006). Há uma grande discussão em literatura sobre a dificuldade de diagnosticar os CEM e diferencia-los de outras neoplasias da parótida mais

comuns, como o adenoma pleomórfico, enfatizando as confusões citológicas que existe quando estes tumores coexistem (Daneshbod et al., 2007).

O **adenocarcinoma** (ACAR) representa 14% dos carcinomas das glândulas salivares. É mais freqüente na quinta década de vida e na glândula parótida; acometendo homens e mulheres em igual freqüência. Quando surge nas glândulas menores, o palato é o sítio mais freqüente, seguido pela mucosa jugal, língua e soalho da boca (Klintonberg et al., 1984; Seifert et al., 1986; Spiro, 1986). Os ACAR diferenciam-se dos outros tumores de glândulas salivares por apresentarem infiltração precoce dos tecidos do nervo facial, levando a um quadro doloroso, com paralisia facial em 40% dos casos. Há um alto índice de metástases linfonodais (60%) e pulmonares (30%). O prognóstico depende do seu tamanho e do local da lesão, sendo favorável quando ocorre nas glândulas salivares menores. O diagnóstico diferencial é com o carcinoma adenóide cístico, carcinoma mucoepidermóide bem diferenciado e carcinoma de células ductais (Batsakis, 1999).

O **carcinoma ductal salivar** (CDS) é um tumor maligno incomum da glândula salivar que apresenta um prognóstico desfavorável. A glândula parótida, seguida pela glândula submandibular, são os sítios de origens mais comuns. Estes tumores também acometem mais raramente as glândulas sublinguais e salivares menores. Os CDS ocorrem mais freqüentemente em pacientes com mais de 50 anos de idade e são quatro vezes mais comuns em homens do que mulheres. Os sintomas típicos incluem rápido crescimento de uma massa que pode ser indolente e variar em tamanho (Urban et al., 2002; Huh et al., 2003). Este tumor representa uma classe de tumores morfológicamente remanescentes do carcinoma ductal de mama. Embora o último seja bem caracterizado, são limitadas as informações imunofenotípicas e citogenéticas dos CDS (Hungermann et al., 2006). Não há tratamentos estabelecidos para a doença avançada, a maioria dos pacientes com CDS passa por terapia sistêmica paliativa. Recentemente, Prat et al. (2007) relataram o uso de *Trastuzumabe* como terapia coadjuvante em casos de CDS avançados.

Alterações genéticas e moleculares nos TGS

De modo geral, a gênese das neoplasias é um processo que envolve muitas etapas, na qual alterações genéticas importantes acumulam-se e são responsáveis pela imortalização das células. A frequência dessas alterações genéticas difere entre os vários tipos de neoplasias. A inativação de genes supressores de tumores e/ou a ativação de genes responsáveis pela proliferação celular estão envolvidos na patogênese desse processo (Loeb e Loeb, 2000; Loeb, 2001).

Múltiplos fatores de risco têm sido identificados no desenvolvimento dessas neoplasias, dentre eles destacam-se a exposição à radiação ionizante, agentes químicos e biológicos, dos quais os vírus são os principais (Ellis e Auclair, 1996). No entanto, os mecanismos biológicos responsáveis pelo seu comportamento clínico não estão bem esclarecidos, o que tem suscitado a procura por marcadores moleculares que colaborem na previsão desse comportamento (Hall e Going, 1999).

O câncer dificilmente surge a partir de um único gene defeituoso, pelo contrário, deriva de uma somatória de defeitos em diferentes genes ligados ao sistema de proteção do genoma e/ou ao controle da expressão dos programas de proliferação celular. Há evidências que diferentes alterações genéticas estão associadas a diferentes tipos de câncer, em termos de proliferação e invasividade, portanto a resposta a ao tratamento irá variar dependendo do tipo de alterações genéticas e dos alvos moleculares afetados (Sidransk, 2002).

Recentes estudos têm utilizado com grande frequência técnicas de biologia molecular para detecção de mutações em genes envolvidos na proliferação celular e genes supressores de tumores. Técnicas baseadas na PCR (*polymerase chain reaction*) têm sido utilizadas como ferramentas para identificar alterações em nível de DNA, uma vez que esta molécula é bem conservada e pode ser amplificada a partir de pequenas quantidades (Baumforth et al., 1999). Uma técnica que vem sendo explorada é a hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization*- CGH), a qual permite a detecção de alterações de ganhos ou perdas de DNA em um único experimento (Kallioniemi et al., 1992; Weiss et al., 1999). A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos de estudos de CGH em tumores de glândulas salivares descritos em literatura.

Tabela 1. Alterações genômicas freqüentemente observadas em TGS pela metodologia de CGH.

Alteração cromossômica		Tipo de TGS (nº de casos analisados)	Referência
Ganhos	Perdas		
8q; 12q	-	APM (1)	Rao et al. (1998)
19	6q; 12q; 13q	CAC (24)	El-Rifai et al. (2001)
20p 16; 20; 22q 9q; 18q; 22q	5q; 9q; 16q - 2q; 4q	AP (2) CAC (1) ACCB (1)	Toida et al. (2001) Toida et al. (2001) Toida et al. (2001)
8q	-	CEM (19)	Hungermann et al. (2002)
4p; 6q; 12p; 13q; 15q11.2- q21; 21p	19p	CXAP (7)	Morio et al. (2002)
1p; 8q; 11p; 11q; 12q; 14q; 16q; 17q; 19p; 19q; 20q; 22q; Xq 1q; 3p; 3q; 4q; 5p; 5q; 6p; 6q; 7q; 10q; 11p; 11q; 12p; 12q; 13q; 15q; 16p; 16q; 18p; 18q; 19q; 21q; Xq 1p; 1q; 2q; 3p; 3q; 3q; 4p; 5p; 5q; 6p; 7p; 7q; 8q; 9p; 9q; 10p; 11p; 12p; 12q; 13p; 13q; 14q; 15q; 16p; 16q; 18p; 18q; 19p; 20p; 21q; Xp; Xq	- 8p 1p; 5q; 8p; 14q; 16p; 16q; 22q	AP (10) CAC (6) ACAR (3)	Kasamatsu et al. (2005) Kasamatsu et al. (2005) Kasamatsu et al. (2005)
16p; 17q; 22q	6q	CAC (27)	Freier et al. (2005)
8; 18	1p; 6q; 12q	CAC (53)	Rao et al. (2008)
4q; 5p; 5q; 13q	11q; 12q; 15q; 16p; 16q; 17p; 20q; 22q	TW (15)	Giefing et al. (2008)
4q; 5p; 5q; 6q; 13q	11q; 12q; 15q; 16p; 16q; 17p; 20q; 22q	AP (14)	Giefing et al. (2008)
X	1; 2; 15	CME (19)	Verdorfer et al. (2009)

ACAR: adenocarcinoma; ACCB: adenocarcinoma de célula basal; AP: adenoma pleomórfico; APM: adenoma pleomórfico metastizante; CAC: carcinoma adenóide cístico; CEM: carcinoma epitelial-mioepitelial; CME: carcinoma mucoepidermóide; CXAP: carcinoma ex-adenoma pleomórfico; TW: tumor de Warthin.

Considerando-se as dificuldades de classificação baseada na histologia e no comportamento clínico dos TSG, diversas técnicas têm sido empregadas visando um melhor conhecimento sobre a biologia destas lesões. Entretanto, os estudos citogenéticos e moleculares são limitados tanto no escopo como no tamanho da amostra e não levam em consideração a heterogeneidade morfológica e biológica destes tumores (Press et al., 1994; Jones et al., 1996; El Nagar et al., 1997; Holst et al., 1999; Toida et al., 2001; Nasser et al., 2003).

O **adenoma pleomórfico** pode ser considerado uma exceção à regra. Esta lesão é considerada uma das neoplasias benignas de origem epitelial melhor caracterizada do ponto

de vista das alterações citogenéticas. O banco de dados de alterações cromossômicas em câncer elaborado por Mitelman et al. (2009) (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) apresenta resultados citogenéticos em 224 adenomas de glândulas salivares. Estes estudos mostraram que cerca de 70% dos casos de AP apresentam cariótipos anormais e com o aprimoramento das metodologias de investigação cromossômica este número deve aumentar. As alterações mais comumente observadas compõem translocações balanceadas como t(3;8)(p21;q12); t(8;9)(q12;p22) e t(5,8)(p13;q12); inversões envolvendo 12p12-p13 e 12q15-q24; e alterações não balanceadas envolvendo 8p23 e 8q12 (Bullerdiek et al., 1987; Sandros et al., 1990; Rommel et al., 1991; Bullerdiek et al., 1993; Mark et al., 1997; Martins et al., 2005; Kandasamy et al., 2007; Fonseca et al., 2008). A partir destas evidências foram identificados genes envolvidos nos rearranjos balanceados. Dentre estes genes estão incluídos o *PLAG1* (8q12) e o *HMGIC* (12q14-q15) (Geurts et al., 1997; Kas et al., 1997; Voz et al., 1998; Astrom et al., 1999; Tisang et al., 2004; Asp et al., 2006; Kandasamy et al., 2007).

O gene adenoma pleomórfico 1 (*PLAG1*) tem um importante papel no desenvolvimento dos AP. A ativação da expressão deste gene é resultado de uma translocação cromossômica recorrente que pode envolver um grande número de diferentes arranjos (Bullerdiek et al., 1987). Nas duas translocações mais frequentes, t(3;8)(p21;q12) e t(5;8)(p13;q12), a troca do promotor *PLAG1*, que é inativo nas glândulas salivares maduras, por um forte promotor derivado da β -catenina (*CTNNB1*) e por um receptor de fator inibitório de leucemia (*LIFR*), respectivamente, leva à expressão anormal do *PLAG1* nas células tumorais (Kas et al., 1997; Voz et al., 1998). Considerando que o gene *PLAG1* age como regulador transcricional, esta expressão ectópica provavelmente resulta na perda da regulação de genes alvos (Kas et al., 1998; Voz et al., 2000). Adicionalmente, Declercq et al. (2005) demonstraram a forte e aparente capacidade direta de tumorigênese *in vivo* do *PLAG1*.

Asp et al. (2006) e Kandasamy et al. (2007) usando ensaios citogenéticos e moleculares demonstraram a heterogeneidade de rearranjos que ocorrem no gene *PLAG1* e que contribuem para o desenvolvimento de adenomas pleomórficos. Em 2008, Persson et al. avaliaram um subgrupo de AP com cromossomos em anel de derivação incerta utilizando SKY (*Spectral karyotype*), FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) e aCGH (*array-based Comparative genomic hybridization*). Os autores relataram a fusão do gene *FGFR1* com o *PLAG1* e sua contribuição no desenvolvimento dos AP.

Resultados da análise cromossômica dos adenomas pleomórficos metastizantes (APM) demonstraram alterações cariotípicas complexas incluindo rearranjos não- balanceados. Rearranjos em 3p e 9p observados em APM são similarmente encontrados em AP (Jin et al.,

1998). Deleções em 3p também são freqüentemente encontradas numa variedade de neoplasmas epiteliais malignos e é possível que a deleção de um ou mais genes supressores tumorais possa ser importante na progressão metastática de alguns adenomas pleomórficos (Bradley, 2005). Debiec-Rychter et al. (2001) e Martins et al. (2005), por análises imunohistoquímicas e citogenéticas, demonstraram a natureza clonal de diversas células imunofenotípicas dos adenomas pleomórficos, confirmando a teoria de que estes tumores partilham uma origem celular única comum, sendo a maioria proveniente de células progenitoras epiteliais do ducto basal capazes de diferenciação em uma variedade de fenótipos somáticos.

Rao et al. (1998) avaliaram um adenoma pleomórfico metastizante (APM) e sua metástase renal por CGH. Os autores observaram ganhos em 3q26, 8q23-24, 12q14-15 e X; e ausência de perdas no tumor primário. Para a metástase renal foram observados ganhos em 1p32-p36.3, 2q37, 8q23-24 e 12q13-q15; e perdas em 9pter-q21, 11, 15 e Xpter-q21. Os ganhos em 8q23-q24 e 12q13-q15 foram comuns ao tumor primário e a metástase renal. Análises subseqüentes por *Southern blot* do DNA tumoral das metástases com o uso de sondas previamente mapeadas nestas regiões revelaram as ampliações dos genes *MYC* (8q24.21) em 8q23-q24 e *CDK4* (12q14) e *MDM2* (12q14.3-q15) em 12q13-q15. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) dos genes *MYC* e *CDK4/MDM2*, diferencialmente marcados e hibridados em cromossomos metafásicos tumorais, revelaram que estes genes são co-amplificados numa mesma célula, porém em diferentes *double-minutes*.

Em um estudo recente, áreas típicas de adenomas pleomórficos (AP) e de células com mudanças oncócicas (**oncocitomas**), foram microdissecadas e submetidas à aCGH. Hibridação cromogênica *in situ* (CISH) foi realizada para validar alguns achados. Os resultados da aCGH revelaram amplificação em 12q13.3-q21.1 nos dois tumores que foi posteriormente validada por CISH. Não foi observada amplificação ou expressão aumentada do gene *HER2*. O foco da metaplasia oncócica apresentou baixo nível de ganhos em 6p25.2-p21.31. A presença de células atípicas nos casos estudados indicaram evidências de clonalidade, mas não de características malignas. Em adição, a presença da mesma amplificação nos dois tumores sugere que em alguns casos, as células oncócicas podem originar os AP (Di Palma et al., 2007).

Estudos clássicos de citogenética nos **tumores de Warthin** são escassos. Entre estes, alguns identificaram cariótipos normais, enquanto outros alterações numéricas e anormalidades clonais, como a presença esporádica da translocação t(11;19)(q21;p12-13). A identificação de diferentes alterações cromossômicas nos tumores de Warthin sugere que estes

tumores são patogenticamente heterogêneos (Bullerdiel et al., 1988; Mark et al., 1990; Martins et al., 1997). Nordkvist et al. (1994) propuseram a existência de três subgrupos citogenéticos nos TW com: (1) uma linhagem celular aparentemente normal; (2) linhagens celulares normais concomitantes com linhagens anormais; e (3) linhagens celulares anormais.

Martins et al. (1997) analisaram, por técnicas de bandamento G, 12 casos de tumor de Warthin e detectaram aberrações clonais em sete deles (58%), quatro alterações estruturais e três numéricas (perda dos cromossomos Y e X). Perda do cromossomo Y já foi previamente reportada em três casos de TW (Mark et al., 1990; Nordkvist et al., 1994). Duas anormalidades recorrentes, rearranjos em 6p e t(11;19), foram específicas para este tipo de neoplasia.

Várias teorias vêm tentando explicar o desenvolvimento dos tumores de Warthin, mas apenas duas são citadas atualmente. A primeira hipótese mencionada é de heterotopia, e a segunda teoria é que este tumor é um adenoma com concomitante infiltração linfocítica. De acordo com a última teoria, quando são pequenos e têm uma história curta, os TW consistem apenas de componentes epiteliais, e quando são grandes mostram, em adição ao componente epitelial, um estroma linfóide. Diante disto, o componente epitelial seria o elemento neoplásico fundamental. Entretanto, os dados de Honda et al. (2000) mostraram que esta teoria não poderia ser aplicada aos TW.

Honda et al. (2000) estudaram o componente tumoral epitelial e infiltrações linfocíticas de tumores de Warthin para avaliar a clonalidade destas populações celulares em um ensaio baseado na PCR. A análise de clonalidade foi primeiramente descrita por Allen et al. (1992). A estratégia é baseada na heterozigose do gene HUMARA ligado ao cromossomo X e na inativação randômica do cromossomo X por metilação. Esta inativação randômica ocorre durante estágios iniciais da embriogênese e é conservada durante a divisão celular, até nos tumores. Sítios específicos de restrição sensíveis a metilação para *HpaII* são localizados perto destas repetições de trinucleotídeos. O gene metilado não pode ser digerido por *HpaII*, então somente o alelo metilado poderia ser amplificado pela PCR após a digestão. Se o padrão de metilação for uniforme por causa da monoclonalidade, haverá apenas um produto da PCR (alelo) depois da digestão com *HpaII*, entretanto se os padrões de metilação diferiram (policlonalidade), dois produtos da PCR (alelos) serão observados. Sete dos 16 casos de mulheres analisados foram heterozigotos e informativos para o polimorfismo HUMARA. Posteriormente, os componentes epiteliais destes sete casos foram microdissecados (apresentando mais de 90% de células epiteliais) e submetidos à extração de DNA e análise HUMARA. Todos os sete casos mostraram padrões de proliferações policlonais, apresentando

dois produtos da PCR após a digestão com *HpaII*. Segundo Teymoortash e Werner (2005), os tumores de Warthin não podem ser considerados verdadeiros neoplasmas, pois uma neoplasia é definida como um processo monoclonal, e tanto o componente epitelial quanto o linfonodal destes tumores foram relatados como policlonais.

Em outro estudo, Arida et al. (2005) microdissecaram os componentes epiteliais e linfonodais de 12 amostras de tumores de Warthin e investigaram 13 marcadores de microssatélites próximos ou em genes supressores tumorais conhecidos e validaram por imunohistoquímica a expressão dos genes *TP53* e *TP16*. Os autores encontraram expressão negativa para os genes em estudo e não observaram nenhuma perda de heterozigose significativa.

As investigações utilizando técnicas de citogenética nos casos de **carcinoma ex-adenoma pleomórfico** são escassas. Os estudos existentes apontam para a participação de alterações em 17p, 8q e 12q assim como o observado para os casos de AP (Mark et al., 1980; Johns et al., 1996; Yamamoto et al., 1996a; El-Naggar et al., 1997; Gillenwater et al., 1997). Neste contexto, foram relatados rearranjos e translocações envolvendo os oncogenes *MDM2* e *HMGIC* que podem estar relacionados com desenvolvimento do CXAP e/ou transformação maligna do AP em CXAP. Entretanto, o papel definitivo destes oncogenes nos AP ainda não foi definido (El-Naggar et al., 2000). Diferentes autores relataram a ausência dessas alterações ou a presença de trissomia do cromossomo 8 ou cariótipos complexos (El-Naggar et al., 1998; Roijer et al., 2002).

El-Naggar et al. (2000) usando análises de perda de heterozigose (LOH) propuseram um modelo genético para o desenvolvimento e progressão dos CXAP: LOH em 8q levaria ao desenvolvimento de adenomas pleomórficos benignos, enquanto LOH em 12q caracterizaria adenomas com potencial de transformação para carcinoma com a aquisição da LOH em 17p. Este modelo foi proposto devido à baixa incidência de LOH nos marcadores em 8q em adenomas microdissecados e indica o envolvimento diferencial desta região no adenoma de CXAP e em adenomas pleomórficos benignos. Em outro estudo, Tsang et al. (2004) avaliaram um caso de CXAP por CGH *array* e relataram ampliações dos genes *MDM2*, *MYC*, *PLAG1* e outros mapeados em 8q11.2-13 (*MGC2177*, *PSMC6P*, *LYN*). Estes resultados foram validados por RT-PCR quantitativa em tempo real.

Expressão elevada e a amplificação da proteína *HER2/neu* foram observadas em CXAP invasivos. Di Palma et al. (2005) analisaram 11 casos de CXAP, por imunohistoquímica e FISH, e demonstraram que a positividade para o HER2 era restrita ao carcinoma ductal salivar ex-AP invasivo, enquanto áreas benignas de AP foram

consistentemente negativas. Os autores propuseram que a amplificação do *HER2* ocorre em estágios iniciais da transformação maligna dos AP e que este pode ser um útil marcador de transformação maligna nos AP.

Alguns relatos demonstraram a presença de mutações do gene *TP53* e o acúmulo da proteína p53 em casos de CXAP, mas não em AP pré-existentes (Nordkvist et al., 2000; Lewis et al., 2001; Freitas et al., 2005). Porém, não se sabe quando a mutação do gene *TP53* está associada a estágios iniciais (intracapsular) ou tardios (extracapsular) do processo de transformação maligna dos CXAP (Ihrler et al., 2007). Ihrler et al. (2007) propuseram um modelo de múltiplas etapas na progressão dos AP para CXAP baseados em achados moleculares e histológicos. Enquanto os AP são caracterizados por uma população de células mistas, a maioria com predominância de células luminais e com um grupo de translocações cromossômicas bem caracterizadas, a transformação dos carcinomas intraductais em CXAP é associada com um alto nível de inativação gênica e funcional do gene supressor tumoral *TP53* somente em células luminais do AP.

Os primeiros estudos citogenéticos em **carcinomas mucoepidermóides** indicaram a presença freqüente de rearranjos em 11q14-q21 e 19p12-p13, especialmente a translocação t(11;19)(q21;p12-13). A t(11;19) foi relatada, algumas vezes, como a única alteração detectável (El-Naggar et al., 1997). Curiosamente, alguns tumores de Warthin também apresentaram esta translocação (Bullerdiek et al., 1988).

Em 2003, Tonon et al. identificaram os genes alvos da translocação t(11;19). Dois genes estão envolvidos neste evento: *MECT1* e *MAML2* mapeados em 19p13 e 11q21, respectivamente. Esta translocação origina o gene quimérico *MECT1-MAML2* que possui o éxon 1 de *MECT1* fusionado com os éxons 2-5 de *MAML2*. O produto desta fusão *MECT1-MAML2* altera o mecanismo normal da via de sinalização Notch, ativando genes alvos-*Nocht* independentemente de sinais exógenos, representando, assim, um novo mecanismo de função Notch na tumorigênese. A sinalização Notch tem sido implicada na manutenção de um estágio indiferenciado de células-tronco, decisão de divisão binária das células, e indução de diferenciação, todas importantes etapas da tumorigênese. A expressão do transcrito quimérico e a conseqüente disfunção da via de sinalização Notch poderiam ser então responsáveis pelo desenvolvimento do tumor (Tonon et al., 2004). Em adição, a recente identificação do produto do gene *MECT1* como um potente co-ativador para genes que são regulados por elementos responsivos cíclicos - AMP - sugere que *MECT1-MAML2* possa talvez alterar ambas as vias de sinalização, Notch e CREB, para induzir a tumorigênese (Enlund et al., 2004; Martins et

al., 2004). A fusão *MECT1-MAML2* tem sido demonstrada como eficiente em transformar células neoplásicas “in vitro” (Wu et al., 2005).

Komiya et al. (2006), buscando determinar se a fusão *MECT1-MAML2* era essencial para o crescimento do tumor, construíram seqüências de RNAi capazes de inibir *in vivo* o mRNA quimérico destes genes em linhagens celulares tumorais de CME. O grupo concluiu que “ganho de função” em decorrência da expressão aberrante de *MECT1-MAML2* pode ser um alvo a candidato terapêutico nestas neoplasias. Okabe et al. (2006) detectaram a fusão deste gene em 27 de 71 CME estudados (38%) e sugeriram que esta alteração deve ser específica para um subtipo de MEC que exibe características clínicas-patológicas favoráveis e um curso clínico indolente. Tirado et al. (2007), usando técnicas de RT-PCR e seqüenciamento relataram a presença da fusão *MECT1-MAML2* em tumores de Warthin com a translocação t(11;19). Em outro estudo recente, Bell et al. (2008) identificaram pela primeira vez os transcritos fusionados do gene *MECT1-MAML2* em TW e CME coincidentes (3/3), e na porção maligna dos TW. Isto estabelece uma associação clonal comum de alguns destes tumores e sugere o papel deste transcrito quimérico no desenvolvimento dos TW com propensão a transformação maligna.

Recentemente, Verdorfer et al. (2009) avaliaram 19 amostras FFEP de **carcinomas mucoepidermóides** por CGH, FISH em núcleos interfásicos e RT-PCR para a detecção do transcrito fusionado *MECT1-MAML2*. A análise de CGH demonstrou ganhos do cromossomo X e perdas de cromossomos inteiros ou regiões nos cromossomos 1, 2 e 15, como as alterações mais freqüentes. O rearranjo *MAML2* foi detectado em 37% dos tumores analisados por FISH interfásico, enquanto 58% das amostras mostraram expressão do transcrito fusionado *MECT1-MAML2*. Os autores concluíram que a presença do rearranjo *MAML2*, como também do transcrito fusionado *MECT1-MAML2* está associado a um prognóstico favorável e pode ser um marcador clínico de predição útil para o comportamento biológico desses tumores, como previamente relatado.

Em tumores de glândulas salivares, a aneuploidia é geralmente associada a estágios e graus avançados, como também com o risco aumentado de recorrência e diminuição da sobrevida (Enamorado et al., 2004). Em **carcinomas adenóides císticos**, tem sido relatada uma associação entre aneuploidias e um comportamento mais agressivo (Hamper et al., 1990; Luna et al., 1990; Tylor et al., 1993).

Estudos citogenéticos clássicos em CAC mostraram um número relativamente limitado de alterações genéticas, incluindo deleções ou translocações em 6q21-q24, translocações em 9p13-p23, e mais raramente, ganhos dos cromossomos 7 e 8 (Nordkvist et

al., 1994; Mark et al., 1996; Martins et al., 1996). Análises de FISH e LOH revelaram deleções em 17p13 e anormalidades para o locus do gene *TP53* em mais da metade dos casos de CAC avaliados (Yamamoto et al., 1996b; 1998b). Perdas de 1p, 2p, 6q e 17q e 19q avaliadas por estudos de LOH foram também relatadas (Johns et al., 1996).

Estudos utilizando CGH em CAC identificaram perdas em 12q12-q14, 6q23-qter e 13q21-q22 e ganhos do cromossomo 19 (El-Rifai et al., 2001). Em outro estudo, Rutherford et al. (2005) realizaram uma análise extensiva de LOH em 58 CAC, usando um painel de 28 marcadores de microssatélites, e identificaram 66% de perda genética ao todo, sugerindo locos preferenciais de genes supressores tumorais envolvidos na patogênese deste tipo de tumor. Os autores combinaram os resultados na análise de LOH com a análise de expressão gênica em microarrays em CAC. Um número de genes em 12q12-q13 foi encontrado com expressão diminuída, incluindo genes regulatórios como *Homeobox C5 (HOXC5)* e *Activin A Receptor Type II-like I (ACVRL1)*, e genes relacionados à diferenciação celular fenotípica como *Aquaporin 5 (AQP5)* e *Keratin 7 (KRT7)*. Em 12q24 foi observada a redução da expressão dos genes *TCF-1*, *ZNF10/KOX1*, *OAS1* e *P2RX4* sugerindo que há uma forte regulação negativa destes genes em CAC.

Freier et al. (2005) avaliaram 27 CAC por CGH e relataram ganhos de 22q13 (nove casos), 16p (sete casos) e 17q (quatro casos); e perdas em 6q (seis casos). A região 22q13 foi investigada por FISH em *tissue microarrays* e os autores verificaram que ganhos em 22q13 é um evento molecular decisivo no desenvolvimento de carcinomas adenóides císticos, independente da diferenciação histológica. Em outro estudo, Vékony et al. (2007) analisaram 18 CAC por CGH array e observaram ganhos genômicos significativos em 9q33.3-q34.3, 11q13.3, 11q23.3, 19p13.3-p13.11, 19q12-q13.43, 21q22.3 e 22q13.33. Nestas regiões estão mapeados numerosos fatores de crescimento e seus receptores (*FGF*, *PDGF*, *FGFR3*, *PDGFRB*, *FGFR*), sugerindo o envolvimento destes genes na iniciação e progressão dos CAC.

Recentemente, Rao et al. (2008) utilizaram CGH e FISH em 53 casos de CAC primários. As alterações mais freqüentes encontradas foram perda de 1p32-p36 em 44% dos casos, seguido de 6q23-q27, e 12q12-q14. Os ganhos mais freqüentes foram nos cromossomos 8 e 18. Dessas alterações, a perda de 1p32-p36 foi a única anormalidade significativamente associada a uma pior sobrevida dos pacientes com CAC.

Hungermann et al. (2002) utilizaram CGH em 12 mioepiteliomas e mostraram perdas significativas em três deles. Nos **carcinomas epiteliais-mioepiteliais**, foram detectadas alterações citogenéticas em 10 de 19 amostras investigadas por CGH. Em cinco casos foram

observadas aberrações envolvendo o cromossomo 8. Em outro estudo, Hungermann et al. (2005) estudando carcinomas mioepiteliais e mioepiteliais malignos relataram que os perfis de CGH mostraram apenas algumas alterações cromossômicas recorrentes. Os perfis de perdas e ganhos genômicos diferiram entre as diferentes localizações do tumor, sugerindo que as alterações são adquiridas durante a progressão tumoral aumentado as suspeitas de malignidade. Em 2009, Vékony et al. avaliaram 27 tumores primários (15 mioepiteliomas e 12 carcinomas epiteliais-mioepiteliais) por aCGH e concluíram que os dois tipos histológicos apresentam uma frequência elevada de ganhos genômicos ($\geq 20\%$) principalmente em locos de fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento (*PDGF*, *FGF*, *FGFR* e *EGFR*). Em mioepiteliomas foi detectada alta frequência de perdas ($\geq 20\%$) nas regiões de proto-oncogenes. A análise de *clusters* permitiu a identificação de três tipos: um contendo uma mistura dos dois fenótipos (n=10); outro contendo a maioria dos tumores benignos (n=10) e o último contendo os carcinomas (n=7). Tanto a análise supervisionada quanto a não supervisionada entre os tumores benignos e malignos revelou ganho em 8q (36 Mbp) mais frequentemente encontrado nos tumores malignos das glândulas salivares, evidenciando a hipótese do envolvimento desta região no fenótipo maligno dos mioepiteliomas de glândulas salivares.

Hungermann et al. (2006) analisaram 23 casos de **carcinomas ductais salivares** por histologia convencional, imunohistoquímica, hibridação *in situ* e hibridação genômica comparativa (CGH). A análise de CGH dos CDS revelou um aumento no número de alterações em doença avançada, mas nenhuma alteração recorrente foi observada. A análise de agrupamentos dos CDS sugeriu muitos padrões distintos de expressão proteica comuns para os sítios primários de CDS e carcinomas ductais de mama, explicando a morfologia paralela existente entre estes dois tipos de neoplasias.

Em 2001, Toida et al. avaliaram dois casos de **adenoma pleomórfico**, um **carcinoma adenóide cístico** e um **adenocarcinoma de células basais** (ACCB) por CGH. Os AP mostraram perdas em 5q12.4-q14.1, 9q12-q21.13 e 16q11.2; e ganhos em 20p12.1. Os CAC mostraram ganhos nos cromossomos 16, 20, e 22q12.3-q13.1; e ausência de perdas. O ACCB mostrou ganhos em 9q21.1-pter, 18q21.1-q22.3 e 22q11.23-q13.31; e perdas em 2q24.2 e 4q25-q27. O estudo mostrou alterações comuns para os dois casos de adenomas pleomórficos (perdas em 9q12-q21.13 e 16q11.2); e também entre o carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma de células basais estudados (ganho em 22q12.1-q13.1).

Jin et al. (2001) analisaram cinco **adenomas pleomórficos**, três **carcinomas adenóides císticos** e um caso de **carcinoma mucoepidermóide**, **carcinoma ex-adenoma**

pleomórfico e **adenocarcinoma**, pela metodologia COBRA-FISH (*Combined binary ratio-FISH*) e FISH. A análise confirmou a existência de deleções em 6q, uma alteração comum aos TGS, e a presença da translocação t(6;9). Outros rearranjos que foram revelados por FISH incluem amplificação em 12q (*MDM2* e *CDK4*) em um AP. Também verificaram o status do gene *PLAG1* em quatro casos (um AP, um CXAP, um CAC, e um CME) com rearranjos em 8q12. Somente em dois casos os resultados de FISH foram compatíveis com os rearranjos intragênicos, sugerindo a importância desta técnica na elucidação de rearranjos genômicos.

Morio et al. (2002) microdissecaram os componentes adenomatoso e carcinomatoso de sete **carcinomas ex-adenomas pleomórficos** (CXAP) e utilizaram a CGH para avaliar não balanceamentos genômicos destes componentes. Os componentes carcinomatosos foram morfológicamente classificados em carcinomas de células escamosas (2 casos); carcinomas de células escamosas concomitante com adenocarcinomas (2 casos); adenocarcinoma (1 caso); carcinoma de ducto salivar (1 caso) e carcinoma mucoepidêmico (1 caso). Os componentes benignos mostraram uma aparência morfológica convencional dos adenomas pleomórficos em todos os CXAP. Todos os sete componentes carcinomatosos e seis de sete componentes adenomatosos demonstraram várias alterações genômicas. Nos sete componentes carcinomatosos que apresentaram ganhos, as aberrações mais frequentes foram observadas em 6q25 (quatro casos). Seis de sete componentes adenomatosos mostraram ganhos. Os ganhos recorrentes no componente adenomatoso foram detectados em 13q12 e 15q 11.2 (3 casos em cada). Três componentes carcinomatosos apresentavam perdas em 8q, 10q21 e 12q e 22q (dois casos em cada). Perdas em 19p foram observadas em dois de quatro componentes adenomatosos. Em cinco de sete CXAP, regiões cromossômicas idênticas como 4p, 6q, 12p, 13q, 15q11.2-q21, 19p e 21p foram envolvidas em alterações nos componentes adenomatoso e carcinomatoso de uma mesma lesão. Os resultados sugeriram ainda que o acúmulo e/ou maior número de alterações cromossômicas, incluindo anormalidades em 6q, podem estar associadas com o desenvolvimento de componentes carcinomatosos em um subgrupo de CXAP.

No estudo publicado por Kasamatsu et al. (2005) foram analisados dez casos de **adenomas pleomórficos**, seis **carcinomas adenóides císticos** e três **adenocarcinomas** de glândula salivar por CGH. A análise comparativa das regiões mínimas comuns entre os CAC e os demais casos de TGS detectou ganhos em 1q32, 6p25, 6q21-q24, 7q11.2, 7q31, 10q11.2, 11p12-q12, 12q13, 12q14, 13q24, 16p13.3-13.2, 18p11.3, 18q23, 19q13.4 e Xq28; e ausência de perdas genômicas. Usando *cDNA microarrays* em uma plataforma de 38 000 genes em uma amostra de CAC os autores relataram que 3162 genes mostraram aumento de expressão e

1269 diminuição da expressão. Foram identificados 262 genes envolvidos com câncer. Entre estes, os genes *TP73L* e *PTTG1*, que modulam *MYC* e *VEGF*, apresentaram aumento de expressão e número aumentado de cópias genômicas. Os resultados indicaram que a análise concomitante do perfil de perdas e ganhos e de expressão gênica é uma estratégia importante na identificação de genes alterados em tumores de glândulas salivares. Os estudos de expressão gênica têm demonstrado diferentes perfis de expressão em diversos genes quando grupos de TGS são comparados, comprovando a heterogeneidade destas lesões.

Fowler et al. (2006) examinaram uma série de tumores malignos mistos (**carcinosarcoma, carcinoma ex-adenoma pleomórfico e adenoma pleomórfico metastizante**), para mutações usando um painel de genes supressores tumorais que foram implicados na patogênese dos TSG. Estes genes incluem locos mapeados em 3p26, 5q23, 9p21, 17p13, 17q21 e 18q21, que correspondem às áreas que contem os supressores tumorais *VHL*, *hOGG1*, *APC*, *CDKN2*, *TP53*, *NM23* e *DCC*. O grupo demonstrou que a frequência de perdas alélicas e mutações para os carcinomas e as áreas de sarcomas nos carcinosarcomas de glândulas salivares são similares, evidenciando que todos os elementos malignos nestes tumores são derivados de um precursor clonal comum. Além disso, os componentes benignos do CXAP não mostraram alto nível de perda de frequência alélica. Os autores demonstraram que os carcinosarcomas apresentam uma maior frequência de mutações do que os CXAP.

Santos (2007) analisou 11 casos de **adenomas de células basais** (AB) de dez pacientes e cinco casos de **adenocarcinomas de células basais** (ACCB) de quatro pacientes, por hibridação genômica comparativa de alta resolução (HR-CGH). A comparação entre os ABs e ACCBs permitiu a identificação de regiões genômicas alteradas presentes exclusivamente em cada um dos tipos tumorais. Perdas em 4p14-p15.1, 10q25-q26, 14q24-q31 e 19q13.2-q13 e ganhos em 22q13 foram alterações características dos ACCBs. Por outro lado, em ABs foram observados ganhos em 2q37, 3p24-p26, 4q33-q35, 5q23-q31, 7p22, 10q25-q26, 11p15, 11q25, 15q26, 18p11.3 e 20q13.2-q13.3. A análise pela HR-CGH revelou que a despeito das semelhanças histológicas compartilhadas por adenomas de células basais e adenocarcinomas de células basais, as duas lesões apresentam perfis genômicos distintos com relação a perdas e ganhos de material genético.

Giefing et al. (2008) avaliaram por CGH 29 amostras de TGS, incluindo 15 **tumores de Warthin** e 14 **adenomas pleomórficos** localizados na parótida (27) e na glândula submandibular (2). Foi observado um padrão diferente aos relatados para os carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (CCECP), mas nenhuma diferença significativa foi

observada entre os TW e AP. Contudo, vários genes supressores tumorais e oncogenes foram identificados nas regiões mínimas comuns. Os autores encontraram deleção freqüente do gene *Harakiri* (12q24.2) em 12/29 tumores e do gene *TP53* (17p13.1) em 11/29 tumores como potenciais supressores tumorais em carcinomas de glândula salivar. Adicionalmente, detectaram uma amplificação freqüente da região 13q22.1-q22.2 em 13/29 casos contendo os genes *KLF5* e *KLF12*. O gene *KLF5* regula a expressão da survivina, um oncogene expresso na maioria dos cânceres humanos. As alterações observadas podem indicar eventos genéticos na formação dos tumores de glândula salivar. Especialmente a amplificação de 13q pode contribuir com o mecanismo de expressão da survivina e progressão tumoral.

Recentemente, Persson et al. (2009) usando FISH, SKY, aCGH e RT-PCR avaliaram 16 tumores, incluindo seis **adenomas pleomórficos** e dez **carcinomas ex-adenomas pleomórficos**. Os autores observaram amplificações/ganhos recorrentes em 1q11-q32.1, 2p16.1-p12, 8q12.1, 8q22-24.1 e 20; e perdas em 1p21.3-p21.1, 5q23.2-q31.2, 8p, 10q21.3 e 15q11.2. Foram identificadas amplificações dos genes *HMGA2* (12q15) e *MDM2* (12q14.3-q15) em AP e CXAP, sugerindo que amplificação na região 12q (em particular no gene *MDM2*), deleções em 5q22.1-q31.2, ganhos em 8q12.1 (*PLAG1*) e 8q22.1-q24.1 (*MYC*), e amplificação de *HER2* (17q21.1) podem ser importantes para a transformação maligna de AP.

Estes relatos reforçam a necessidade de um estudo em maior número de casos para a melhor caracterização das alterações genômicas tumor-específicas associadas a neoplasias de glândulas salivares.

Hibridação Genômica Comparativa (CGH)

A metodologia da CGH, primeiramente descrita em 1992 por Kallioniemi et al., permite a análise de alterações cromossômicas em todo genoma, independente da avaliação de células metafásicas do tecido em estudo. Esta técnica requer a obtenção de DNA das células a serem investigadas e, desta forma, é uma abordagem que apresenta vantagens na investigação de desequilíbrios genômicos, especialmente em tumores sólidos (Rogatto e Rainho, 2000).

A detecção de ganhos e perdas específicas no genoma abriu caminho não apenas para a pesquisa na área de oncogenética, permitindo a descoberta de uma série de novos genes relacionados com o câncer, mas também trouxe implicações na área clínica, permitindo a implantação de diagnósticos diferenciados, avaliação prognóstica de algumas doenças e o direcionamento de tratamentos (Gebhart, 2004).

O procedimento padrão é a marcação de DNA tumoral e de referência (normal) em iguais razões molares com diferentes haptenos (por exemplo, DNA tumoral ou teste marcado com biotina dATP e controle normal ou referência com digoxigenina dUTP). Este conjunto de sondas marcadas é misturado para permitir uma competição entre elas quando da hibridização em metáfases normais. A quantidade de DNA teste ou de referência ligado ao cromossomo normal é quantificada pela intensidade da fluorescência, tomando-se como referência a hibridação dos DNAs normais. O poder de resolução da CGH para detectar ganhos e perdas de pequenas regiões genômicas depende do grau de condensação dos cromossomos metafásicos e do número de cópias deletadas ou duplicadas na amostra tumoral (Rogatto e Rainho, 2000). Para amplificações, o limite de detecção é atingido quando a unidade total do amplicon (tamanho da região amplificada multiplicada pelo número de cópias) é maior do que 2Mb (Piper et al., 1995). Um baixo número de ganhos e perdas, como trissomias e deleções, é detectado somente quando a região não-balanceada tem pelo menos 10-20 Mb (Kallioniemi et al., 1994; Bentz et al., 1998).

Dentre as vantagens desta metodologia, está a possibilidade de localização de seqüências em excesso ou ausentes no genoma tumoral, a triagem para aberrações não balanceadas, a não necessidade de preparações cromossômicas das amostras tumorais e a detecção de deleções que não podem ser distinguidas por bandamento G. A principal limitação da técnica é a não detecção de rearranjos cromossômicos, como translocações recíprocas ou inversões. Resultados pobres de hibridação podem ocorrer devido à presença de restos celulares ou por sondas de DNA contaminadas com grande quantidade de proteínas ou de tamanho inapropriado (Verma e Babu, 1995).

Os avanços recentes na técnica da CGH permitiram a detecção de aneusomias de pequenas regiões cromossômicas (Kirchhoff et al., 1999). Este procedimento, conhecido como CGH de Alta Resolução (HR-CGH) (Kirchhoff et al., 1997; 1998), possibilita o aumento da sensibilidade e especificidade na detecção de não balanceamentos genômicos. A utilização da HR-CGH permite a detecção de deleções no alcance de 3-5 Mbp, utilizando intervalos de referência padronizados com amostras normais em detrimento de intervalos fixados (Kirchhoff et al., 1999; 2001). Schoumans et al. (2004) demonstraram que a HR-CGH pode ser usada para detectar deleções inferiores a 1,8Mb, entretanto, em alguns casos rearranjos >5Mb não foram detectados.

Em suma, a HR-CGH é utilizada para avaliação de alterações no número de cópias genômicas permitindo a identificação de alterações que normalmente não podem ser observadas por um cariótipo convencional. Além disso, não há desvio para a análise de qualquer região cromossômica em particular e necessita-se de uma pequena quantidade de DNA (Kirchhoff et al., 2001).

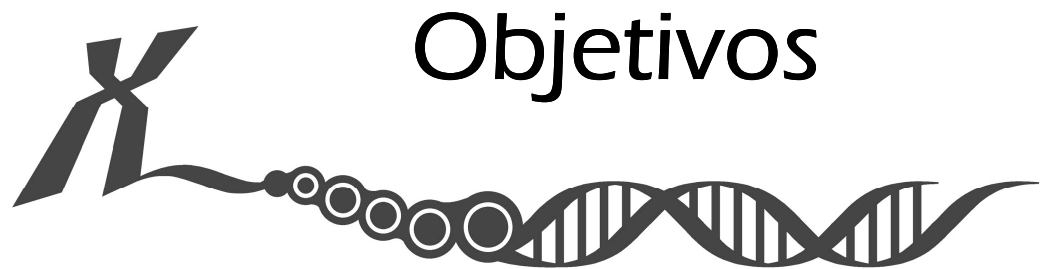


Justificativas

Justificativas

Apesar dos esforços atuais para identificar novos marcadores úteis ao diagnóstico, prognóstico e como terapia alvo em tumores de glândulas salivares, pouco progresso tem sido alcançado. Estes tumores compreendem uma classe heterogênea histologicamente e em sua biologia. Além disso, há um número limitado de relatos em literatura avaliados em nível citogenético e/ou molecular.

A análise de regiões genômicas preferencialmente envolvidas em tumores de glândulas salivares poderá contribuir para o conhecimento de genes candidatos associados a sua gênese ou progressão de além de permitir o avanço do conhecimento destas patologias pouco estudadas sob o aspecto molecular.



Objetivos

Objetivos

- ✓ Avaliar alterações genômicas (ganhos e perdas de regiões cromossômicas) utilizando a metodologia de HR-CGH (*High Resolution Comparative Genomic Hybridization*) nos diversos tipos histológicos de neoplasias de glândulas salivares;
- ✓ Identificar alterações genômicas mínimas comuns a cada tipo histológico;
- ✓ Correlacionar os perfis genômicos dos diferentes tipos tumorais e identificar alterações comuns e diferentes em subgrupos de tumores;
- ✓ Investigar a expressão gênica e protéica de um subconjunto de genes selecionados após a análise das alterações genômicas identificadas pela HR-CGH.



Material e Métodos

1. Casuística

Foram selecionadas 64 amostras de neoplasias de glândulas salivares, obtidas dos Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica e do Banco de Tecidos do Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, para a aplicação da metodologia da HR-CGH. Todos os pacientes autorizaram o estudo por Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado e que se encontram nos arquivos do referido Hospital. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do referido hospital (CEP- nº 443/02). Os prontuários médicos dos casos selecionados para o estudo foram consultados para a obtenção de informações clínico-patológicas relevantes para o estudo como: idade, sexo, consumo de tabaco, consumo de álcool, local do tumor, data da cirurgia, tipo de cirurgia, comprometimento de linfonodos, tamanho do tumor (maior eixo do tumor em cm), recidiva, presença de segundo tumor primário, seguimento clínico e data do último retorno (**Anexo 1**).

Entre estas 64 amostras estão incluídas: 27 adenomas pleomórficos (AP); 11 tumores de Warthin (TW); 6 carcinomas ex-adenomas pleomórficos (CXAP); 6 carcinomas adenóides císticos (CAC); 4 carcinomas mucoepidermóides (CME); 3 carcinomas ductais salivares (CDS); 3 adenocarcinomas (ACAR); 2 oncocitomas (ON) e 2 carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEM). Destas amostras, 47 estavam fixadas em formalina e em blocos de parafina (FFEP) e 17 eram provenientes de tecidos a fresco.

A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a *WHO International Classification of Tumors* (Barnes et al., 2005). O estadiamento clínico foi determinado pelo sistema TNM (T: Tumor, N: envolvimento de linfonodos, M: metástase) do câncer (AJCC, 1992). Os pacientes não receberam tratamento quimioterápico ou radioterápico previamente à ressecção cirúrgica.

Para a avaliação da expressão gênica por qRT-PCR em tempo real dos genes candidatos detectados pela HR-CGH foram selecionadas 36 amostras de adenomas pleomórficos e 3 amostras tecidos normais de glândulas salivares (adjacente à lesão benigna) (**Anexo 2**). Destas, seis amostras foram previamente utilizadas na análise de HR-CGH. Para a avaliação da expressão protéica por imunohistoquímica foram selecionados 47 casos de tumores de Warthin (FFEP) (**Anexo 3**). Destes, onze casos foram previamente utilizados na análise da HR-CGH.

2. Métodos

2.1 Microdissecção dos espécimes

Foram realizados dois procedimentos para microdissecção: manual e a laser, dependendo da presença ou número de células não tumorais. Na microdissecção a laser, as biópsias incluídas em parafina passaram por cortes histológicos de 5 µm para a confecção das lâminas. Os cortes foram então microdissecados a laser para seleção e captura de 500-2000 células cujo tecido foi previamente aderido em lâminas de vidro e corado com hematoxilina-eosina, com a utilização do aparelho *Pix Cell II Laser Capture Microdissection* (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, EUA). O tecido obtido foi coletado em “cap” apropriado para extração de DNA.

Na microdissecção manual, foram obtidos cortes histológicos sequenciais de 8 µm de material fixado e em blocos de parafina. Estes cortes foram depositados sobre lâminas de vidro, sendo utilizadas para cada caso entre 8 a 10 lâminas dependendo da quantidade de tecido tumoral presente em cada corte. Após isso, as lâminas foram submetidas a processo de remoção de parafina e desidratação em banhos de xilol e álcool, respectivamente. Após o tratamento, as lâminas contendo os cortes de tecido tumoral foram microdissecadas usando-se lâminas estéreis de bisturi. Como referência usou-se a lâmina corada por hematoxilina e eosina, previamente utilizada na seleção dos casos, visualizada por microscopia óptica. O tecido removido da lâmina de vidro foi colocado em microtubos e procedeu-se à extração do DNA.

2.2 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada por meio do uso de digestão com proteinase K (Roche, Mannheim, Germany). Os cortes microdissecados foram incubados em tampão de digestão (10 mM Tris pH 8,3; 1 mM EDTA; 0.5% Tween 20; 500 ug/mL de Proteinase K) durante 12 horas a 37°C. Os microtubos com as amostras microdissecadas a laser foram invertidos para permitir a ação dos tampões de digestão. Procedeu-se a centrifugação e então o *cap* foi removido e observado para verificar a permanência de células não-digeridas. Em seguida, a enzima foi inativada por aquecimento a 95°C durante 10 minutos. O DNA foi extraído utilizando-se de 1mL solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e por fim 1mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante final foi transferido para outro tubo onde foi feita a precipitação do DNA adicionando-se etanol absoluto gelado e

acetato de amônio 7M que permaneceu durante 12 horas a -20°C. Após centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos, o precipitado obtido foi dissolvido em água ultra-pura estéril e quantificado em *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000*.

2.3 Hibridação Genômica comparativa de alta resolução (HR-CGH)

A hibridação e a detecção do DNA teste e referência em preparações cromossômicas normais ocorreu como descrito por Kallioniemi et al. (1994), com algumas modificações. As amostras a fresco foram marcadas pela reação de *nick translation* e as amostras FFEP foram marcadas por protocolo baseado na PCR.

2.3.1 Marcação por *Nick Translation*

Para uma reação de volume final de 100µL, utilizou-se em média 4µL (2µg/µL) de DNA teste, 10µL de solução 10X Biotina dNTPs (biotina-14-dATP-Gibco), 2µL de DNase I 10mM (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) e 1µL de DNA polimerase I 10U (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Para o DNA de referência foi utilizada a digoxigenina como molécula repórter, sob as mesmas condições de marcação descritas acima, adicionando a solução 20X digoxigenina dNTPs (digoxigenina-11-dUTP, Roche, Mannheim, Germany), ao invés de biotina-14dATP, e acrescentando além dos demais reagentes o tampão de incubação 10X digoxigenina. A solução foi mantida a 16°C durante 30 minutos.

O produto da reação de marcação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1% durante 45 minutos a 100V para determinação do tamanho dos fragmentos de DNA marcados e de sua concentração pela comparação com marcadores de peso molecular (100pb DNA Ladder- Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) e de concentração pré-estabelecidos (250ng, 50ng e 100ng). A digestão enzimática do DNA foi controlada para a obtenção de fragmentos entre 500 e 2000 pares de bases.

Para bloquear a ação das DNaseI/DNA polimerase I foi utilizada uma solução de 10 µL de EDTA 0,5M. Os fragmentos foram precipitados com 10µL de DNA de esperma de salmão 10µg/µL como carreador, 10µL acetato de sódio 3M e etanol absoluto. O precipitado foi ressuspenso em água estéril na concentração final de 10ng/µL, baseado na concentração estimada no gel de agarose, e estocado por 12 horas a -20 °C.

Um total de 100ng de DNA marcado com biotina (teste) e 100ng de DNA marcado com digoxigenina (referência) foi precipitado na presença de 1µg/µL de DNA Human Cot-1, acetato de sódio 3M e etanol absoluto. A sonda foi ressuspenso em 35µL de hibrisol VII e

desnaturada a 75°C durante 10 minutos. A sonda desnaturada permaneceu a 37°C durante uma hora para o pré-anelamento.

2.3.2 Marcação por *SCOMP* (Single Cell Comparative Genomic Hybridization)

Os DNAs obtidos das amostras FFEP foram marcados por uma abordagem baseada na reação em cadeia da polimerase e no uso de oligonucleotídeos adaptadores denominada *SCOMP* (Single Cell Comparative Genomic Hybridization) (Stoecklein et al., 2002).

2.3.2.1 Primeira Amplificação por *SCOMP*

As reações de clivagem com a endonuclease de restrição *MseI*, ligação dos adaptadores e primeira amplificação pela PCR foram realizadas no mesmo tubo para prevenir a perda de fragmentos genômicos. Inicialmente, o DNA foi submetido à clivagem com 24U da endonuclease de restrição *MseI* (50.000 Unidades, New England Biolabs), em tampão universal (10mM de Tris-acetato pH 7.5, 10mM de acetato de magnésio, 50mM de acetato de potássio) a 37°C durante 3 horas. A enzima foi inativada à 65°C durante 5 minutos. Em um tubo separado, os adaptadores foram formados pelo pareamento dos oligonucleotídeos *LIBI* (5'-AGTGGGATTCCCTGCTGTCAGT-3') e *ddMseI* (5'-TAACTGACAGCdd-3'). Uma solução contendo 15nM de cada oligonucleotídeo em tampão universal foi submetida a um gradiente decrescente de temperatura de 65° a 15°C (1 minuto por °C). Após o pareamento dos oligonucleotídeos adaptadores, foram adicionados 1µL de dATP 10mM e 5U de T4 DNA ligase (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Esta mistura foi transferida ao DNA tratado com a endonuclease *MseI* e incubada a 15°C por 16 horas.

Após a ligação dos adaptadores, o kit Expand Long PCR System (Roche, Mannheim, Germany) foi utilizado para a amplificação primária. A reação foi realizada em um volume final de 41µL contendo 2.5mM de cada dNTP, 3µL de Expand Long Template buffer, 1,1µL Expand Long Template Pol Mix 3,5U/µL e 35µL de água ultra-pura estéril. A amplificação ocorreu em um termociclador programável PTC 200 (MJ Research) e consistiu de 1 ciclo de 68°C por 3 minutos; 15 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 8 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 68°C por 1 minuto e 45 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 22 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 53 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 1 ciclo de 68°C por 3 minutos e 40 segundos. Em seguida, os produtos amplificados foram purificados usando o *QIAquick PCR Amplification Kit* (*QIAGEN*), conforme recomendações do fabricante.

2.3.2.2 Segunda Amplificação por *SCOMP*

Foram utilizados 2,0µL do produto purificado como molde numa segunda reação de amplificação para marcação dos fragmentos, contendo 4µL de *Expand Long Template buffer*, 1,6µL do oligonucleotídeo *LIB1* 10µM, 1,4µL de *7/8 Nucleotide Mix* (10mM de cada dGTP, dATP e dCTP + 8,75µL de dTTP), 1,75µL de *digoxigenina 11-dUTP* (para o DNA de referência) ou *biotina 16-dUTP* (para o DNA teste) e 2µL de *polimerase mix* 5U/µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos; 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 20 segundos adicionais/ciclo. Em todas as amostras, o oligonucleotídeo *LIB1* foi removido pelo tratamento com a enzima de restrição *TruI* (Fermentas), conforme as instruções recomendadas pelo fornecedor. Posteriormente, a enzima foi inativada a 65°C por 3 horas.

Alíquotas contendo quantidades equimolares de DNA (teste e referência) foram co-precipitadas na presença foram co-precipitadas na presença de 100µL de *Human Cot-1* DNA e de 10µL DNA de esperma de salmão, 10µL de acetato de sódio 3M e 400µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido à -20°C durante uma noite ou, alternativamente, a -70°C durante 1 hora. Após centrifugação a 14000 rpm, 4°C durante 45 minutos, o precipitado foi lavado em etanol a 70%, centrifugado à vácuo, sendo que o mesmo foi ressuspenso em 30µL de Hybrisol VII (Q-Biogene), desnaturado à 75°C por 10 minutos e mantidos à 37°C por, no mínimo, 1h para etapa de pré-anelamento.

2.3.3 Preparações cromossômicas

Para a hibridação das sondas marcadas diferencialmente, foram utilizadas lâminas contendo preparações cromossômicas obtidas após cultivo de linfócitos de sangue periférico de indivíduos normais. A cultura de sangue periférico de indivíduos normais seguiu o protocolo de Moorhead et al. (1960) com algumas modificações. Em resumo, uma alíquota de 500µL de linfócitos, obtidos após punção de sangue periférico com o anticoagulante heparina, foi cultivada em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) suplementado com antibióticos e soro bovino fetal e estimulada com fitohemaglutinina (Sigma, USA) por 71 horas à 37°C. Adicionou-se colchicina 0,0016% (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) por 1 hora adicional à 37°C. Utilizou-se KCl 0,075M como solução hipotônica e fixador recém-preparado (metanol:ácido acético 3:1). O procedimento de fixação foi repetido três vezes. Após o gotejamento do material nas lâminas, estas foram envelhecidas por um período de três

a quatro semanas antes do procedimento de hibridação e estocadas à temperatura ambiente para uso posterior.

2.3.4 Condições de Hibridação e Tratamento Pós-Hibridação

As lâminas foram desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% (5 minutos cada) e secas em temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram incubadas em 10% pepsina (Sigma, USA) e 0,01N HCl a 5 min (37°C). As lâminas foram transferidas em 2XSSC por 5 min (37°C), seguidas de desidratação em série de etanol 70%, 90% e 100%. Incubou-se em 70% formamida/2XSSC durante 2 min à 72°C para desnaturação. Após a desnaturação, transferiu-se imediatamente para uma série de etanol 70%, 90% e 100% gelado por 5 min cada. As lâminas foram secas antes da hibridação.

A hibridação se processou pela adição de 30µL da sonda em lamínula, aplicação sobre a lâmina, vedação com *rubber cement* e incubação em câmara escura à 37°C por 72 horas. Posteriormente, processou-se a lavagem em formamida 50%/2XSSC por 5 min, duas vezes à 45°C (solução pré-aquecida). A reação foi bloqueada com 40µL de bloqueador I (0,1M Tris HCl; 0,15M NaCl; 0,5%BSA) e 40µL de TNB (3% albumina bovina sérica, 0,1% Tween 20; 4XSSC) por 30 minutos à 37°C (câmara escura). O DNA biotilado foi detectado utilizando-se avidina-fluoresceína isotiocianato (FITC) (Roche, Indianápolis, USA), enquanto o DNA com a digoxigenina foi detectado por anti-digoxigenina-rodamina (Roche, Mannheim, Germany), na proporção de 9:1. As lâminas foram sobrepostas com lamínula e incubadas em câmara escura durante 30 minutos à 37°C. Procedeu-se a lavagem em 4XSSC/0,1% de Tween 20 à 45°C durante 5 min, por três vezes. As lâminas foram contra-coradas com 8µL de *VectaShield Mounting Media for Fluorescence* com DAPI (Vector, UK).

2.3.5 Seleção e Captura de imagens

Na seleção das imagens das metáfases considerou-se o sinal de hibridação em cada cromossomo individualmente, o sinal de hibridação uniforme na célula, o baixo nível de sinais não específicos (*background*), cromossomos bem espalhados e com pouca ou nenhuma sobreposição, o padrão com no mínimo 400 bandas por lote haplóide e a resolução do bandamento em DAPI reverso para a identificação cromossômica.

Foram capturadas, em média, 30 imagens de metáfases de cada amostra usando o microscópio Olympus BX61 conectado a um conjunto automático de filtros com um filtro excitador *band pass* para UV/FITC (490nm), DAPI (360nm) e rodamina (570nm) em

objetiva 100X e uma câmara CCD de alta resolução. O *software Applied Spectral Imaging CGH View 4.0* foi utilizado na análise cromossômica. Com este *software* a razão da intensidade de fluorescência rodamina:FITC foi expressa como uma razão vermelho:verde. As regiões cromossômicas de ganhos e perdas foram definidas baseando-se em uma biblioteca de amostras normais, construída a partir da marcação reversa (biotina e digoxigenina), utilizando-se DNA masculino (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) e DNA feminino (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) com um limite de confiança de 99.5%. Foram capturadas e analisadas metáfases para a construção da biblioteca de referência. Os intervalos de referência são extraídos da biblioteca que delimita o padrão normal dos experimentos considerando os mesmos critérios de seleção de metáfases, padrão de hibridação e condições gerais de análise pré-estabelecidas. O intervalo de referência é assinalado em azul e representa o intervalo de confiança das amostras normais. As barras indicando perdas (vermelho) e ganhos (verde) aparecem quando o intervalo de referência da amostra não se sobrepõe ao do intervalo de referência da biblioteca. O arquivo gerado da biblioteca de casos normais foi utilizado na comparação de cada um dos casos. Essa biblioteca é subdividida em duas, casos normais marcados por SCOMP (138 metáfases) e marcados por *nick translation* (74 metáfases), as quais foram independentemente usadas dependendo do tipo do procedimento usado na amostra a ser investigada. Cada imagem de metáfase foi analisada individualmente para o padrão de hibridação de cada um dos cromossomos. Cromossomos com *background*, sobrepostos ou com marcação irregular quando comparados aos demais da mesma metáfase foram eliminados da análise. As razões médias dos perfis finais foram determinadas a partir das imagens de metáfases que mostraram um padrão homogêneo de hibridação (em média, 15 a 20 metáfases para cada caso). Ao final da análise, os resultados obtidos foram agrupados e as regiões significativamente alteradas foram identificadas em cada caso. Na análise comparativa de cada grupo tumoral as regiões mínimas de perdas e ganhos genômicos foram consideradas quando presentes em mais que 40% e 30% dos casos, respectivamente.

2.4 RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR em tempo real)

2.4.1 Extração de RNA total

O RNA total, referente às amostras de adenomas pleomórficos selecionadas para o estudo de qRT-PCR em tempo real, foi extraído por meio do método de trizol-clorofórmio e

pelo Rneasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a extração por meio de trizol-clorofórmio, o RNA total foi extraído a partir de amostras dos tecidos tumorais adequadamente pulverizadas em cadinhos com nitrogênio líquido. Após a pulverização, adicionou-se 1mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA), que permaneceu em temperatura ambiente até adquirir consistência líquido-viscosa pela lise das células do tecido. Esse material foi transferido para um tubo de 2mL que foi levado ao vórtex (20 segundos) e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida seguiu-se a adição de 300µL de clorofórmio, homogeneização, incubação por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 14.000 rpm a 2°C por 25 minutos.

Após a centrifugação, a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5mL, onde se adicionou 500µL de isopropanol gelado para a precipitação do RNA. Então o tubo contendo a fase aquosa foi incubado por 10 minutos à temperatura e depois foi centrifugado durante 30 minutos a 14.000 rpm a 2°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento contendo RNA foi lavado com 1000µL de etanol 75% (diluído em água DEPC). Centrifugou-se por mais 15 minutos a 14.000 rpm a 2°C e, após remoção do sobrenadante, o material foi mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para secagem do pellet. O RNA foi ressuspensionado em 40µL de água DEPC, levado ao banho seco durante 15 minutos a 65°C e em seguida colocado rapidamente em gelo durante 5 minutos. O RNA das amostras foi eluído em água destilada livre de RNase e estocado à -80°C.

Para a extração pelo Rneasy Mini Kit, aproximadamente 30mg de tecido tumoral microdissecado foi adequadamente pulverizado em cadinho com nitrogênio líquido. Após a pulverização, adicionou-se 600µL do tampão de lise (*Buffer RLT- Lysis buffer*), que permaneceu em temperatura ambiente até adquirir consistência líquido-viscosa pela lise das células do tecido. Esse material foi transferido para um tubo de 2mL, agitado manualmente durante 1 minuto e centrifugado por 3 minutos a 13.200 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 350µL de etanol 70% (preparado com água DEPC). Essa mistura foi transferida para a mini coluna acoplada em tubo coletor e foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Adicionou-se 700µL do tampão de lavagem (*Buffer RW1- Wash buffer*) na mini coluna e centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. A seguir, 500µL do tampão de lavagem (*Buffer RPE- Wash buffer*) foi adicionado na mini coluna e esta foi

centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. A lavagem da mini coluna com o tampão de lavagem (*Buffer RPE- Wash buffer*) foi repetida. Após centrifugar a mini coluna por 2 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente, esta foi transferida para um tubo de 1,5mL e foi adicionado nela de 15 a 25µL de água RNase-free, de acordo com a quantidade de amostra. A mini coluna acoplada ao tubo foi centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O RNA das amostras foi eluído em água destilada livre de RNase e estocado à -80°C.

A concentração e integridade do RNA foi avaliada utilizando o NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1) e por eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). As bandas de RNA 18S e 28S foram visualizadas sob luz azul no transluminador Safe Imager™ Blue-light Transilluminator (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA).

2.4.2 Digestão do DNA e Transcrição Reversa

Para evitar contaminação com DNA, as amostras foram digeridas com 1U Dnase I Amplification Grade (Life Technologies, Rockville, MD, USA) em 10X Dnase I Reaction Buffer e 25 mM de EDTA (pH 8.0). As reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Inc., USA) por 15 min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada pelo aquecimento das reações a 70°C por 10 min. O RNA foi transcrito em um volume final de 20µL contendo First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM de cada dNTP, 0,5µg/µL de oligo (dT)₁₈, 0.1 M ditiotreititol e 200 unidades de enzima transcriptase reversa SuperScript™ II (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min e a reação foi subsequente inativada por 15 min a 70°C. O cDNA foi estocado a -80°C.

2.4.3 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

Foram avaliadas 36 amostras de adenomas pleomórficos e três amostras tecidos normais de glândulas salivares foram usadas como controle. A amplificação pela PCR foi realizada no ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para os genes *NEED9*, *PPARG* e *c-MYC*. Os iniciadores *NEED9*, *PPARG*, *MYC* e *HPRT* (gene endógeno) foram delineados utilizando o *software* Primer Express® versão 2.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A diluição dos iniciadores foi realizada para a obtenção de concentração-final de 10µM. Os dados quantitativos foram analisados utilizando o *software* Sequence Detection System (v1.0; Applied Biosystems).

As seqüências dos iniciadores utilizadas para a RT-PCR quantitativa em tempo real para os genes alvos foram: *NEDD9* (*forward* 5' AGGCCCTGACTGTAGCAGC 3' e *reverse* 5' CCTTACCCTGTAGGTGGACGTAATC 3'); *PPARG* (*forward* 5' TGGAGACCGCCCAGGTTT 3' e *reverse* 5' ACTCAGGGTGGTTCAGCTTCAG 3'); *c-MYC* (*forward* 5' GACTCTGAGGAGGAACAAGAAGATGAG 3' e *reverse* 5' GCAGAAGGTGATCCAGACTCTGA 3'); e para o endógeno: *HPRT* (*forward* 5' TCATTATGCTGAGGATTT 3' e *reverse* 5' GGCCTCCCATCTCCTTCA 3').

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra e controle negativo, num volume final de 10µL para cada reação, sendo 5µL do reagente Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0,2µL de cada iniciador 10µM (iniciadores *forward* e *reverse*) e 1µL de cDNA para os genes *NEDD9*, *PPARG*, *c-MYC* e *HPRT*. Todos os genes alvos e o endógeno de cada amostra foram detectados na mesma placa de reação. As condições de reação para todos os iniciadores foram: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1 min. Ao final de cada reação, a curva de dissociação para cada gene testado foi realizada de modo a observar a presença de um único pico referente a um único produto amplificado.

A fluorescência foi capturada e coletada a cada ciclo da PCR, sendo que a intensidade de fluorescência detectada foi diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados gerados foram analisados por um *software* específico (Applied Biosystems, Foster City, CA) e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. A análise de cada reação foi realizada determinando primeiramente o nível basal (*baseline*), que consiste na quantidade de fluorescência lida durante os ciclos iniciais da PCR, onde ocorre pouca alteração de sinal. O *software* desconta os valores dessa fluorescência basal. Em seguida, foi determinado o *threshold*, que deve ser selecionado na fase exponencial da curva da PCR. O ponto em que ocorre intersecção do *threshold* com a curva de amplificação é determinado como Ct, ou seja, o ciclo do *threshold*. Todas as amostras foram comparadas no mesmo *threshold*, porém o Ct varia de acordo com o ciclo em que a curva de amplificação cruza com o *threshold*. Assim, cada amostra apresenta um valor de Ct específico e que está relacionado com a quantidade de cDNA do gene em questão presente na amostra. A quantificação relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct: ciclo do *threshold*; ΔCt - Ct do gene alvo menos o Ct do gene referência (HPRT); $\Delta\Delta Ct$ - ΔCt da amostra tumoral menos o ΔCt da amostra normal).

2.4.4 Análise Estatística

Os genes diferencialmente expressos nos adenomas pleomórficos foram considerados baseando-se nos valores de QR (Quantificação Relativa), em relação às amostras normais de glândulas salivares.

As comparações dos valores de expressão determinados pela qRT-PCR foram realizadas pelos testes de *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*. As análises foram consideradas estatisticamente significativas com $P \leq 0,05$. Para a análise estatística foi utilizado o *software* Graphpad Prism versão 3.0.

2.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

O nível de expressão das proteínas CDH1 (E-caderina) e HRK foi avaliado em 88 cortes referentes a 47 casos de tumores de Warthin. Tecidos fixados em formalina e em blocos de parafina foram seccionados (3 μ m) e estes cortes foram montados em lâminas eletricamente carregadas. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, gradualmente re-hidratadas em uma série de álcool e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peroxidase de hidrogênio 3% e os cortes foram incubados com os anticorpos primários E-caderina (BD Transduction # C20820) (diluição 1:500) e HRK (Abcam, # ab59907) (1:200) por 18h a 4°C. Os cortes foram lavados em PBS (*phosphate buffer saline*), incubados por 30 min com o anticorpo biotilado secundário (Advance™ HRP Link, Dako cod# K4068, Carpinteria, CA, EUA) e mais 30 min com o complexo peroxidase estreptoavidina (Advanced TM HRP Link, Dako Cytomation, K0690, Denmark). A reação foi revelada com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB, Sigma, D-5637, EUA) e contra-corada com hematoxilina de Herris. Lâminas para o controle negativo e positivo foram incluídas em cada ensaio. O escore de positividade foi realizado visualmente pela estimativa da porcentagem de coloração positiva para a membrana (CDH1) e citoplasma (HRK) em 10% das células neoplásicas. As amostras foram agrupadas em: intensidade fraca (1), moderada (2) e forte (3). A extensão da positividade foi avaliada em: marcação até 1/3 do corte (1), 1/3 a 2/3 (2) e mais de 2/3 (3). Para a proteína CDH1 foi avaliada também a marcação positiva da membrana para o ducto de glândula salivar normal e ácinos adjacentes ao tumor de cada caso, quando presentes no corte.



Resultados

1. Análise das alterações genômicas dos TGS

Sessenta e quatro casos de TGS foram analisados por HR-CGH, incluindo 27 AP; 11 TW; 6 CXAP; 6 CAC; 4 CME; 3 CDS; 3 ACAR; 2 ON e 2 CEM.

Em média, 30 imagens de metáfases foram capturadas e analisadas em cada caso, sendo selecionadas em média, 15-20 para a obtenção do perfil de interpretação final. A **Figura 1** ilustra o padrão de hibridação e qualidade das metáfases analisadas para os casos de TGS de amostras FFEP; e a **Figura 2** para os casos de TGS à fresco. Tanto a hibridação como o perfil individual de cada caso foi de ótima qualidade para ambas as metodologias de marcação das sondas.

A comparação com a biblioteca de casos normais para a definição de alterações com nível de confiança de 99,5% mostrou perdas e ganhos genômicos, embora prevalecessem as perdas genômicas. As regiões mínimas comuns de alterações genômicas resultantes da análise de HR-CGH para as 66 amostras de TGS estão representados nos **Anexos 3 e 4**.

As regiões mínimas de ganhos e perdas genômicas comuns a cada tipo tumoral (AP, TW, CXAP, CAC, CME, ACAR, CDS, ON e CEM) estão representadas nas **Tabelas 2-10**. Os ideogramas finais contendo as alterações genômicas comuns mais frequentes para cada tipo tumoral em comparação com a biblioteca de casos normais estão representados nas **Figuras 3-11**.

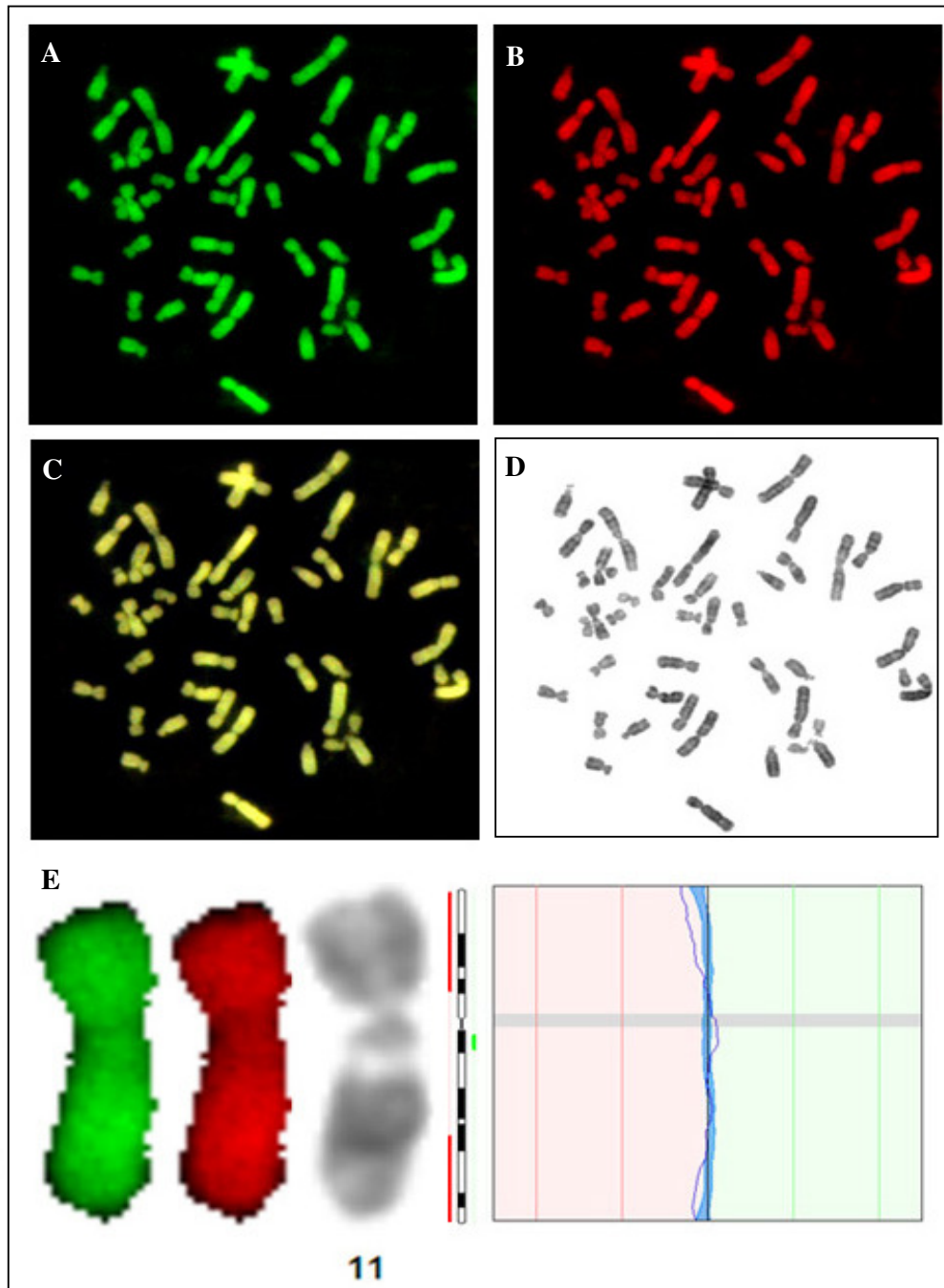


Figura 1. Padrão de hibridação da amostra de tumor de Warthin (TW13). O DNA de amostras FFEP foi marcado pela metodologia de SCOMP. A) Imagem capturada com filtro no espectro verde. B) No espectro vermelho. C) Com filtro triplo. D) Padrão de Banda G (DAPI-reverso). E) A linha em azul escuro indica o perfil de alterações médio de ganhos e perdas ao longo do cromossomo 1. O intervalo azul-claro representa a variação normal entre todos os cromossomos 11 analisados da biblioteca de casos normais. A presença de alterações de perdas e ganhos é detectada quando o perfil médio do caso analisado (linha azul-escuro) ultrapassa os limites do perfil médio da biblioteca (intervalo azul-claro). O desvio da linha azul-escuro para a esquerda indica perdas e para a direita indica ganhos, representados por barras vermelhas e verdes, respectivamente, ao lado do ideograma, indicando a localização cromossômica da alteração.

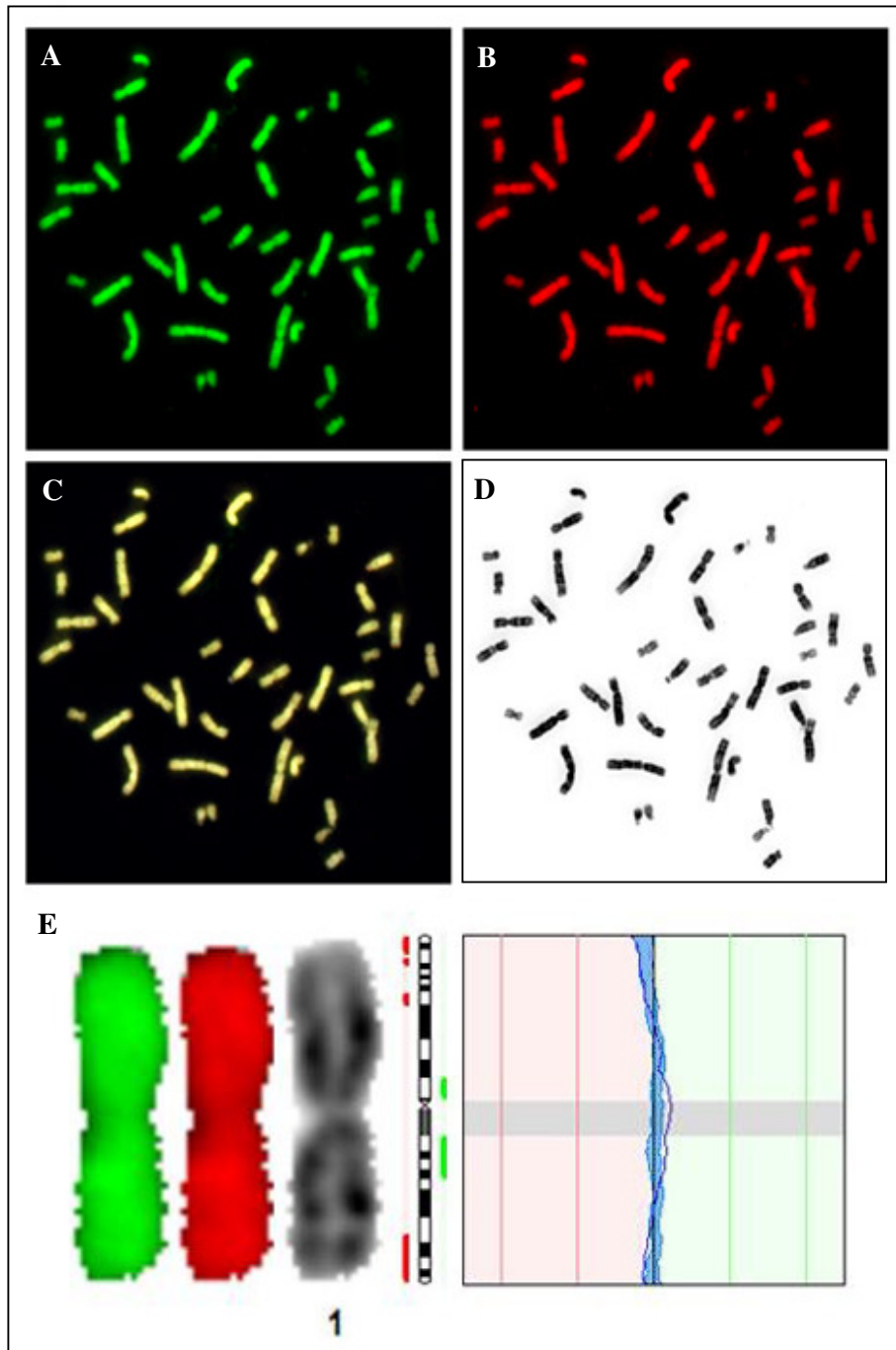


Figura 2. Padrão de hibridação da amostra de carcinoma adenóide cístico (CAC1F). O DNA das amostras a fresco foram marcadas pela metodologia de *nick translation*. A) Imagem capturada com filtro no espectro verde. B) No espectro vermelho. C) Com filtro triplo. D) Padrão de Banda G (DAPI-reverso). E) A linha em azul escuro indica o perfil de alterações médio de ganhos e perdas ao longo do cromossomo 1. O intervalo azul-claro representa a variação normal entre todos os cromossomos 1 analisados da biblioteca de casos normais.

1.1 Adenomas Pleomórficos

Entre os 22 AP de arquivo (FFEP) analisados por HR-CGH utilizando método de marcação baseado na PCR (SCOMP), os **ganhos** mais freqüentes (presentes em mais de 40% dos casos) envolveram 1q22, 1q23, 3p12, 3q12-q13.1, 4q13, 5p15.2-p15.3, 5q23, 7q11.2, 8p23, 11p11.2, 11p12, 11p13, 11p14, 11p15, 11q12, 12p11.2-p12, 17p13 e Yp11.2-p11.3. As **perdas genômicas** presentes em mais de 60% dos casos foram observadas em 1p22, 1p31, 1p32-p33, 1q32, 2p13, 3q21-q22, 3q24, 3q25, 3q26.1, 5q31, 6p12-p21.1, 6p21.3, 6q24, 7p15, 7q31, 7q32-q33, 8q24.1-q24.2, 9q31, 10q21, 10q24-q25, 10q26, 12q21-q22, 12q23, 12q24.1, 12q24.2-q24.3, 14q24, 16p12, 16p13.1, 16p13.2, 16q23, 17q21, 19p13.1-p13.2, 19q13.1, 19q13.2, Xq22, Xq23-q24 e Xq25 (**Tabela 2, Figura 3-A**).

Entre os AP à fresco (cinco casos) avaliados por HR-CGH utilizando marcação por *nick translation*, os **ganhos** mais freqüentes (presentes em mais de 40% dos casos) envolveram as regiões 1p12-p13, 1p34.1-p35, 1q23-q24, 2p11.2-p12, 3q13.3-q21, 7q11.2, 8q12-q13, 10q11.2, 10q21, 11q12-q13 e Xp11.2-p11.4; e as **perdas** (presentes em mais de 60% dos casos) 1q43-q44, 2p21, 2q31-q32, 2q34, 2q35-q37,3-q27, 3q28-q29, 4p13-p15.1, 4q32, 4q33-q35, 5p14-p15.2, 5p15.3, 6q16-q21, 6q23-q24, 7q31-q33, 7q34-q36, 8p21, 8q22-q23, 11q23-q24, 11q25, 12q21-q24.1, 13q21, 13q22-q31, 13q32-q34, 14q21-q31, 15q21, 15q25-q26, 16q12.2-q21, 16q22-q24, 18p11.2, 18q11.2-q23, 19q13.1-q13.2, 20p12, 20p13, 20q11.2, 20q12, 20q13.1-q13.3, 21q22, 22q11.2-q13 e Xq23-q27 (**Tabela 2, Figura 3-B**).

As regiões mínimas comuns consistentes entre os dois grupos de AP foram **ganhos** em 1q23, 7q11.2 e 11q12; e **perdas** em 1q32, 1q41, 2p21, 2q32, 3p23, 4p15.1, 4p15.3, 5p12-p14, 5q13, 6q16-q21, 6q24-q25, 7q31, 7q34-q36, 8q24.1-q24.3, 9p21, 9q32-q34, 11q23-q24, 11q25, 12p13, 12q21-q24.1, 12q24.2-q24.3, 13q21-q22, 14q24, 15q24, 16q22-q24, 17q25, 19q13.1-q13.2, 20p12-p13, 20q11.2, 20q12, 20q13.1-q13.2, 22q13, Xq22 e Xq23-q25 (destacadas na **Tabela 2**).

As perdas genômicas foram mais freqüentes do que os ganhos na análise das 27 amostras de adenomas pleomórficos (**Figura 4**).

Tabela 2. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos detectados entre as 27 amostras de adenomas pleomórficos (AP).

Cromossomos	AP fixadas em formalina e em blocos de parafina (casos)		AP à fresco (casos)	
	Ganhos	Perdas	Ganhos	Perdas
1	1q22 (10); 1q23 (9)	1p21 (14); 1p22 (17); 1p31 (18); 1p32-p33 (15); 1p34.1 (12); 1q32 (16); 1q41 (14)	1p12-p13 (2); 1p34.1-p35 (4); 1q23-q24 (2)	1q32-q41 (2); 1q43-q44 (3)
2	2p25 (7); 2q37 (8)	2p13 (15); 2p14 (13); 2p21-p23 (14); 2p24 (12); 2q32 (13)	2p11.2-p12 (2)	2p21 (3); 2q22-q24 (2); 2q31-q32 (3); 2q33 (2); 2q34 (4); 2q35-q37 (3)
3	3p12 (9); 3q12-q13.1 (10); 3q13.2 (8); 3q29 (7)	3p21 (14); 3p23-p24 (12); 3q13.3 (12); 3q21-q22 (15); 3q23 (12); 3q24 (15); 3q25 (16); 3q26.1 (15)	3q13.3-q21 (2)	3p22-p23 (2); 3q26.2 (2); 3q26.3-q27 (3); 3q28-q29 (4)
4	4q12 (8); 4q13 (9)	4p15.1 (12); 4p15.3 (12)	-	4p13-p15.1 (3); 4p15.2-p15.3 (2); 4q13 (2); 4q32 (4); 4q33-q35 (3)
5	5p15.2-p15.3 (10); 5q23 (9)	5p12 (12); 5p13 (13); 5p14 (14); 5q13 (13); 5q31 (16); 5q32-q33 (12); 5q34 (14); 5q35 (12)	-	5p12-p13 (2); 5p14-p15.2 (4); 5p15.3 (3); 5q12-q13 (2); 5q23-q35 (2)
6	6p24-p25 (8)	6p12-p21.1 (15); 6p21.2 (14); 6p21.3 (17); 6p22 (14); 6q16 (14); 6q21 (12); 6q24 (16); 6q25 (14); 6q26 (12)	-	6q16-q21 (4); 6q23-q24 (4); 6q25-q27 (2)
7	7p21 (7); 7q11.2 (9)	7p13 (13); 7p14 (14); 7p15 (15); 7p21 (13); 7q31 (17); 7q32-q33 (15); 7q34 (13); 7q35-q36 (12)	7q11.2 (2)	7q31-q33 (3); 7q34-q36 (4)
8	8p23 (9)	8q24.1-q24.2 (15); 8q24.3 (12)	8q12-q13 (2)	8p12 (2); 8p21 (3); 8p22-p23 (2); 8q21.3 (2); 8q22-q23 (3); 8q24.1-q24.3 (2)
9	9p23-p24 (8); 9q21 (8)	9p21 (14); 9q22 (14); 9q31 (15); 9q32-q34 (13)	-	9p21 (2); 9p23-p24 (2); 9q32-q34 (2)
10	-	10q21 (16); 10q22 (13); 10q24-q25 (17); 10q26 (15)	10q11.2 (2); 10q21 (3)	-
11	11p11.2 (11); 11p12 (12); 11p13 (9); 11p14 (12); 11p15 (9); 11q12 (9)	11q23-q24 (13); 11q25 (14)	11q12-q13 (2)	11p13-p14 (2); 11q23-q24 (4); 11q25 (3)
12	12p11.2-p12 (9); 12p13 (8)	12p13 (12); 12q15 (13); 12q21-q22 (17); 12q23 (20); 12q24.1 (17); 12q24.2-q24.3 (15)	-	12p11.2-p13 (2); 12q21-q24.1 (3); 12q24.2-q24.3 (2)
13	-	13q21-q22 (14)	-	13q12-q13 (2); 13q21 (4); 13q22-q31 (5); 13q32-q34 (3)
14	14q12 (8)	14q24 (15)	-	14q12-q13 (2); 14q21-q31 (3); 14q32 (2)
15	-	15q24 (13)	-	15q14-q15 (2); 15q21 (3); 15q22-q24 (2); 15q25-q26 (3)
16	-	16p11.2 (13); 16p12 (18); 16p13.1 (17); 16p13.2 (15); 16p13.3 (12);	-	16q12.2-q21 (3); 16q22-q24 (4)

17	17p13 (9); 17q25 (7)	16q22 (14); 16q23 (15); 16q24 (14)	-	17q24-q25 (2)
18	18p11.2 (7)	-	-	18p11.2 (3); 18p11.3 (2); 18q11.2-q23 (5)
19	-	19p13.1-p13.2 (15); 19p13.3 (14); 19q13.1 (15); 19q13.2 (17); 19q13.3 (13)	-	19q13.1-q13.2 (3)
20	20q13.3 (7)	20p12 (14); 20p13 (12); 20q11.2 (13); 20q12 (14); 20q13.1 (12); 20q13.2 (13)	-	20p11.2 (2); 20p12 (4); 20p13 (3); 20q11.2 (3); 20q12 (3); 20q13.1-q13.3 (5)
21	-	-	-	21q21 (2); 21q22 (3)
22	22q13 (8)	22q13 (13)	-	22q11.2-q13 (4)
X	Xp22.1-p22.3 (7)	Xq22 (15); Xq23-q24 (18); Xq25 (15)	Xp11.2-p11.4 (2)	Xq21-q22 (2); Xq23-q27 (3)
Y	Yp11.2-p11.3 (10)	-	-	-

Amostras FFEP (AP15, AP16, AP17, AP18, AP19, AP28, AP29, AP34, AP37, AP39, AP40, AP41, AP43, AP45, AP46, AP47, AP49, AP50, AP51, AP53, AP54 e AP55) e amostras à fresco (AP2F, AP5F, AP7F, AP8F e AP9F) incluídas na análise. Entre parêntesis encontra-se o número de casos em que foi observada a alteração cromossômica. Estão indicadas em **negrito** as alterações comuns observadas entre as amostras a fresco e em FFEP.

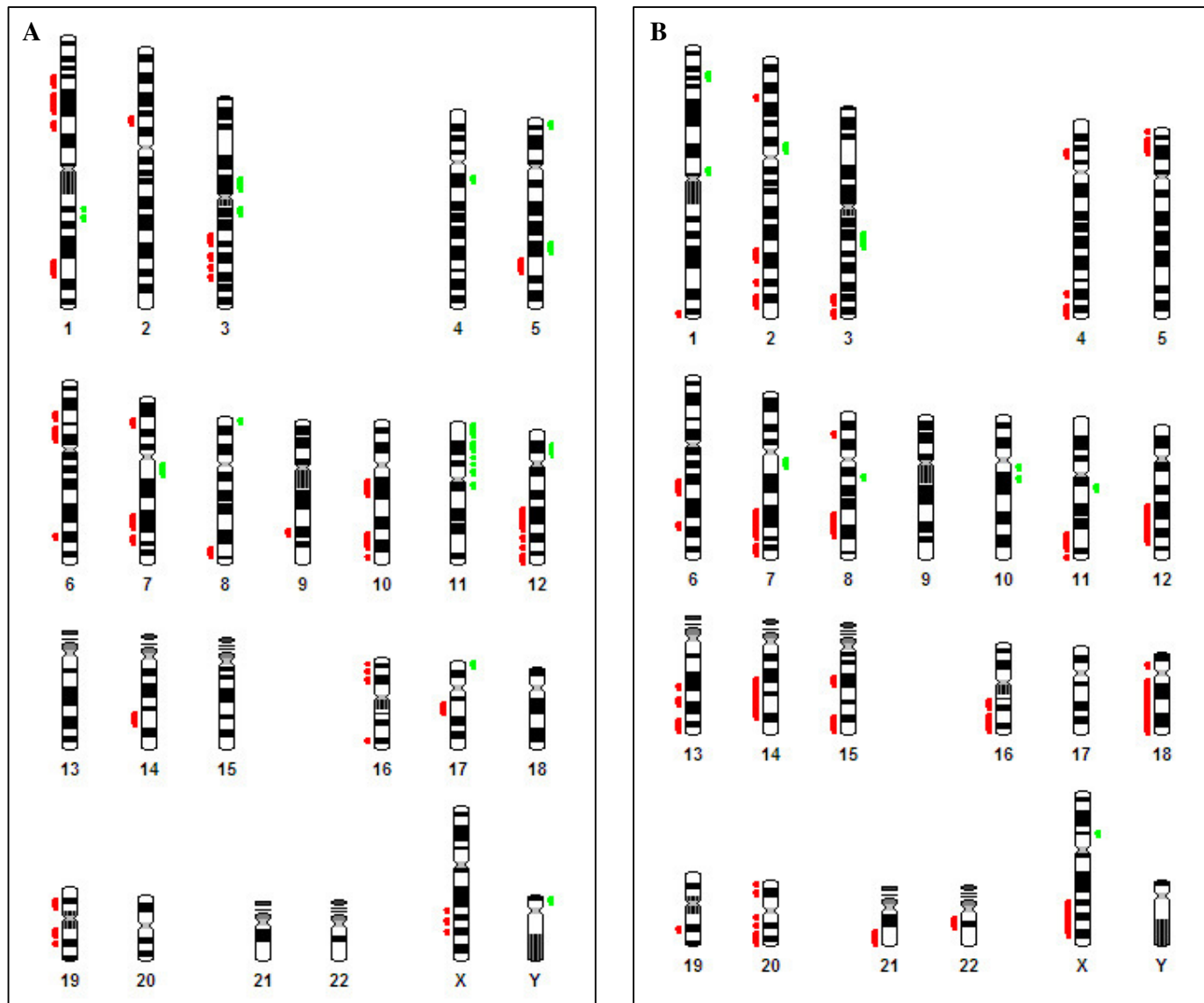


Figura 3. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais frequentes entre as 22 amostras parafinadas de AP (A) e entre as cinco amostras a fresco de AP (B) identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

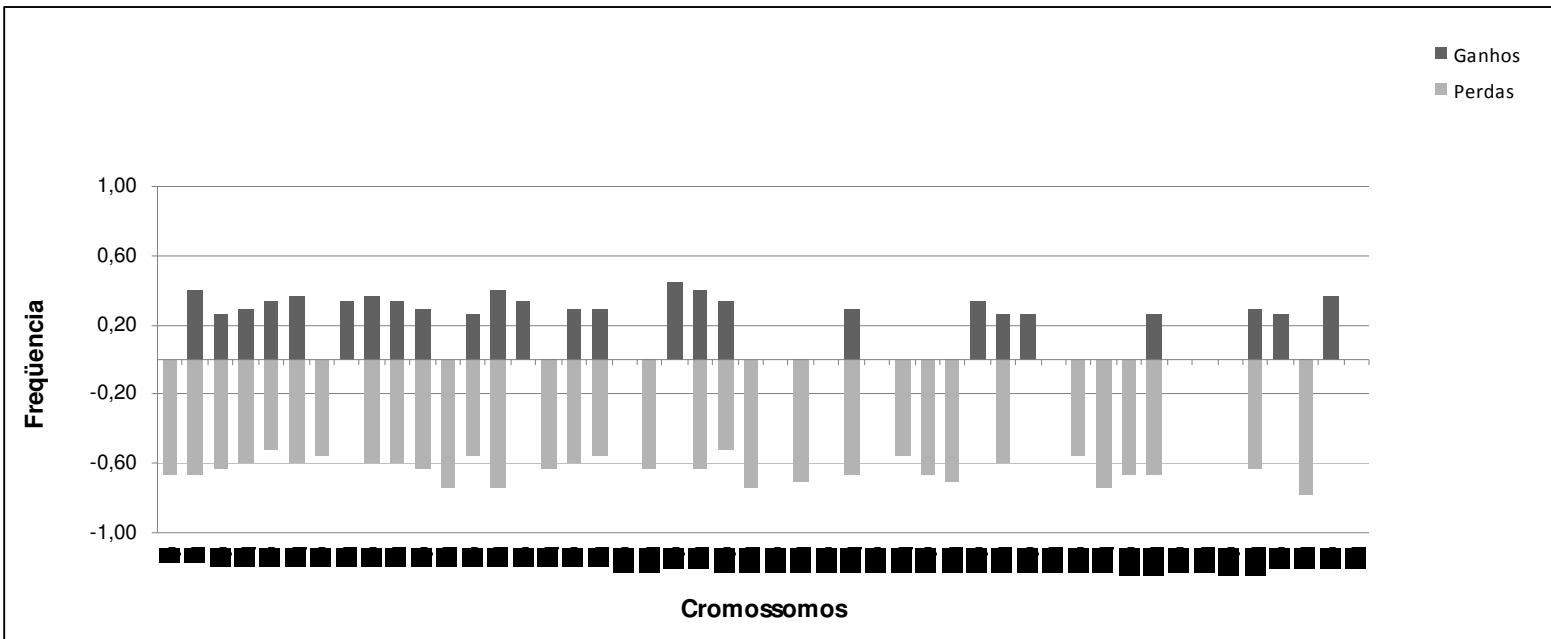


Figura 4. Representação gráfica da frequência de perdas e ganhos cromossômicos detectados por HR-CGH nas 27 amostras de AP analisadas.

1.2 Tumores de Warthin

Entre os 11 tumores de Warthin FFEP analisados, os **ganhos** mais frequentes (presentes em mais de 30% dos casos) foram observados em 4q12-q21, 4q22-q23, 4q24, 4q25, 4q27, 5q21, 7q11.2, 7q21, 11p11.2 e 11q12; e as **perdas** (presentes em mais de 80% do casos) em 1p13-p21, 1p32-p34.2, 1p34.3, 1p35-p36.1, 1q21, 1q22, 1q41, 1q42-q44, 2p16-p21, 2p24, 2q14.1, 2q14.3, 2q36-q37, 3p14, 3p21-p25, 3q13.3, 3q21-q25, 3q27, 4p15.3-p16, 4q31.1, 4q31.2-q34, 4q35, 5q31-q35, 6p22, 6q22, 6q24, 7p12-p22, 7q33-q35, 7q36, 8q22, 8q23, 8q24.1-q24.3, 9p12, 9p13, 9p21, 9p22-p23, 9q22-q34, 10p13-p14, 10q21, 10q22, 10q23, 10q24, 10q25, 10q26, 11p12, 11q22, 11q23-q25, 12q13-q14, 12q21, 12q22-q24.2, 12q24.3, 14q24, 14q31, 14q32, 15q21, 15q22, 15q23-q24, 15q25-q26, 16p11.2-p13.2, 16p13.3, 16q12.1-q24, 17p11.2-p12, 17q11.2-q25, 18p11.2-p11.3, 18q11.2, 18q12, 18q21-q23, 19p13.1-p13.2, 19p13.3, 19q13.1-q13.4, 20p11.2-p13, 20q11.2-q12, 20q13.1-q13.2, 20q13.3, 21q22, 22q11.2-q13 e Xp21-p22.1 (**Tabela 3, Figura 5**).

As perdas genômicas foram muito mais frequentes do que os ganhos na análise das 11 amostras de TW FFEP (**Figura 6**).

Tabela 3. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as 11 amostras FFEP de tumores de Warthin (TW).

Cromossomos	TW parafinados (casos)	
	Ganhos	Perdas
1	-	1p12 (7); 1p13-p21 (9); 1p31 (8); 1p32-p34.2 (10); 1p34.3 (11); 1p35-p36.1 (9); 1p36.2-p36.3 (8); 1q21 (10); 1q22 (9); 1q23 (7); 1q24 (8); 1q25-q32 (7); 1q41 (11); 1q42-q44 (9)
2	-	2p14-p15 (7); 2p16-p21 (9); 2p22-p23 (8); 2p24 (10); 2p25 (7); 2q12-q13 (8); 2q14.1 (9); 2q14.2 (8); 2q14.3 (9); 2q21-q22 (8); 2q34 (7); 2q35 (8); 2q36-q37 (9)
3	-	3p14 (10); 3p21-p25(9); 3q13.3 (9); 3q21-q25 (10); 3q26.1-q26.3 (8); 3q27 (9); 3q28-q29 (8)
4	4q12-q21 (3); 4q22-q23 (4); 4q24 (3); 4q25 (4); 4q27 (3)	4p14 (7); 4p15.1-p15.2 (8); 4p15.3-p16 (10); 4q31.1 (9); 4q31.2-q34 (10); 4q35 (9)
5	5q21 (4)	5p13-p15.1 (7); 5p15.3 (7); 5q12-q13 (8); 5q14 (7); 5q21 (7); 5q23 (8); 5q31-q35 (10)
6	-	6p12 (7); 6p21.1 (8); 6p21.2-p21.3 (7); 6p22 (9); 6p23 (8); 6q16-q21 (7); 6q22 (9); 6q24 (9); 6q25-q27 (8)
7	7q11.2 (4); 7q21 (3)	7p12-p22 (9); 7q22 (8); 7q33-q35 (10); 7q36 (11)
8	-	8p12 (7); 8q22 (9); 8q23 (10); 8q24.1-q24.3 (11)
9	-	9p12 (10); 9p13 (9); 9p21 (11); 9p22-p23 (10); 9q21 (8); 9q22-q34 (10)
10	-	10p12 (7); 10p13-p14 (9); 10q21 (10); 10q22 (11); 10q23 (10); 10q24 (11); 10q25 (10); 10q26 (9)
11	11p11.2 (3); 11q12 (4)	11p12 (9); 11p13-p15 (8); 11q13 (7); 11q14 (7); 11q22 (9); 11q23-q25 (10)
12	-	12p12-p13 (8); 12q13-q14 (10); 12q15 (7); 12q21 (10); 12q22-q24.2 (11); 12q24.3 (10)
13	-	13q31 (7); 13q32-q34 (8)
14	-	14q22 (7); 14q23 (8); 14q24 (10); 14q31 (11); 14q32 (10)
15	-	15q14-q15 (7); 15q21 (9); 15q22 (10); 15q23-q24 (11); 15q25-q26 (9)
16	-	16p11.2-p13.2 (11); 16p13.3 (10); 16q12.1-q24 (11)
17	-	17p11.2-p12 (10); 17p13 (8); 17q11.2-q25 (11)
18	-	18p11.2-p11.3 (11); 18q11.2 (9); 18q12 (10); 18q21-q23 (11)
19	-	19p13.1-p13.2 (11); 19p13.3 (10); 19q13.1-q13.4 (11)
20	-	20p11.2-p13 (11); 20q11.2-q12 (9); 20q13.1-q13.2 (11); 20q13.3 (10)
21	-	21q22 (10)
22	-	22q11.2-q13 (10)
X	-	Xp11.2 (7); Xp21-p22.1 (9); Xq21 (8); Xq22-q27 (8)
Y	-	-

Amostras incluídas na análise: TW5, TW8, TW10, TW12, TW13, TW14, TW15, TW16, TW17, TW18 e TW19. Entre parêntesis estão o número de casos que apresentou a anormalidade

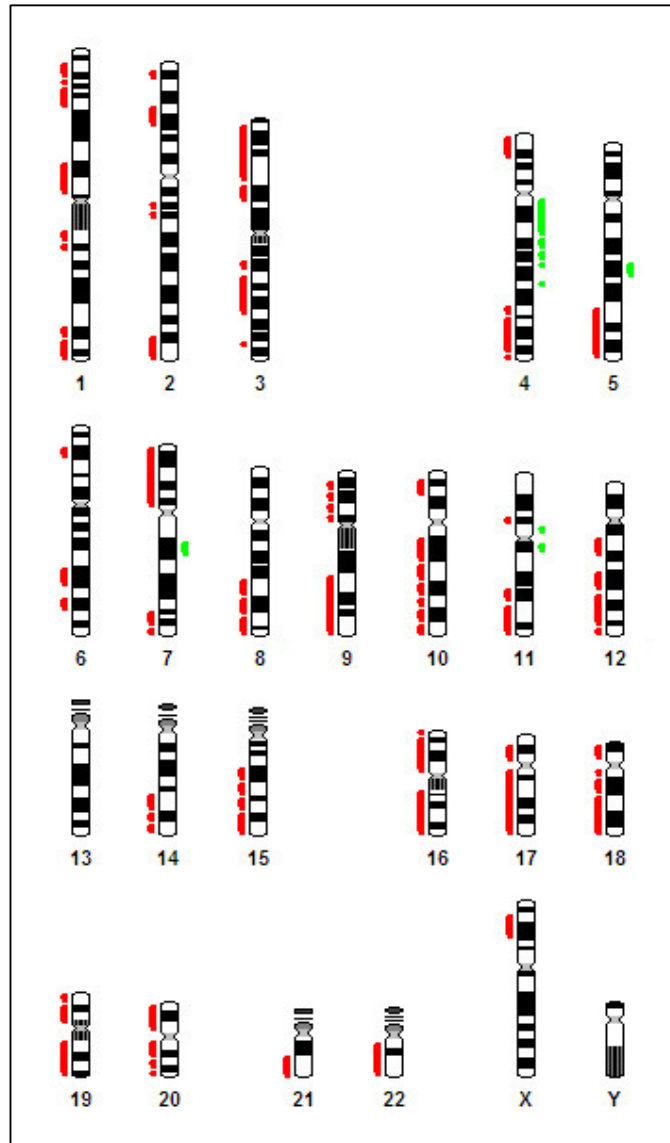


Figura 5. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais frequentes entre as 11 amostras FFEP de tumores de Warthin identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

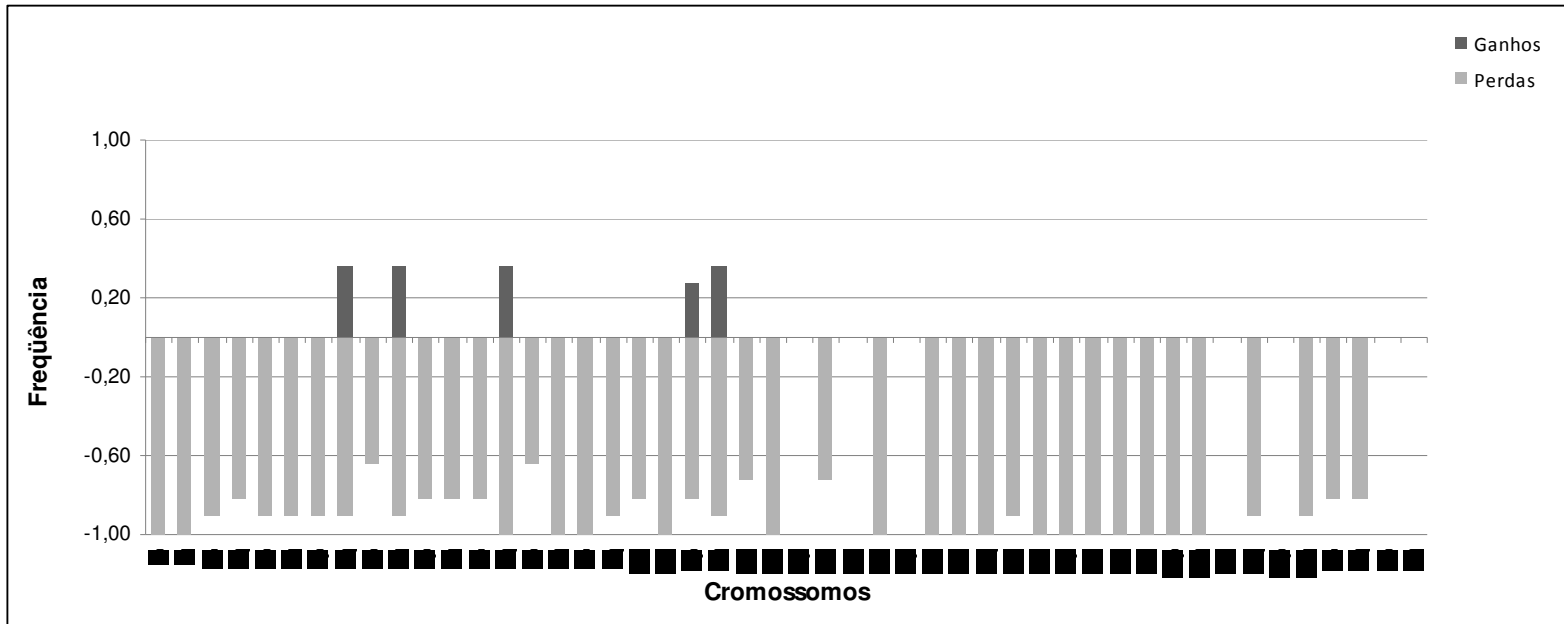


Figura 6. Representação gráfica da frequência de perdas e ganhos cromossômicos nas 11 amostras de TW analisadas por HR-CGH.

1.3 Outros TGS

Entre os seis CXAP fixados e em blocos de parafina, os **ganhos** mais freqüentes (presentes em mais de 50% dos casos) envolveram as regiões 2q33, 2q36, 4q24-q26, 4q34, 8p22-p23, 8q21.3-q22, 11p12, 11p14, 12q14-q15 e 13q14; e as **perdas** (presentes em mais de 70% dos casos) 1p13, 1p21, 1p22, 1p31, 1p32-p35, 1q32, 2p14-p24, 2q34, 3p14, 3p21, 3q21-q24, 4p15.1, 4p15.3, 5q11.2-q14, 5q21, 5q23, 5q31, 5q34, 6p21.3, 6p22, 6q16-q22, 6q23, 6q24-q25, 6q26-q27, 7p12-p13, 7p14-p15, 7p21-p22, 7q11.2-q22, 7q31, 7q35-q36, 8p11.2-p12, 8q23, 9p12-p21, 9p22-p23, 9q21-q22, 9q31-q34, 10p11.2-p12, 10q11.2-q22, 10q25-q26, 11p11.2, 11p14-p15, 11q23, 12p12-p13, 12q22, 12q24.1-q24.2, 13q21-q22, 14q12, 14q13, 14q21-q23, 14q24, 14q31-q32, 15q15, 15q21-q25, 16p11.2, 16p12-p13.1, 16p13.2, 16q12.1-q13, 16q21-q22, 16q23, 17p11.2-p12, 17q11.2-q21, 18p11.2, 18p11.3, 18q12-q21, 19q13.2-q13.3, 20q11.2-q12, 20q13.1-q13.3, 21q22, 22q12-q13, Xp11.4-p21, Xq12-q21 e Yq11.2 (**Tabela 4, Figura 7**).

Tabela 4. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as seis amostras FFEP de carcinomas ex-adenomas pleomórficos (CXAP).

Cromossomos	CXAP parafinados (casos)	
	Ganhos	Perdas
1	-	1p13 (5); 1p21 (4); 1p22 (5); 1p31 (6); 1p32-p35 (4); 1p36.1-p36.3 (3); 1q31 (3); 1q32 (4); 1q41-q42 (3)
2	2q33 (3); 2q36 (3)	2p12-p13 (3); 2p14-p24 (4); 2q13 (3); 2q14.3-q21 (3); 2q34 (4); 2q35-q37 (3)
3	-	3p12-p13 (3); 3p14 (5); 3p21 (4); 3p24 (3); 3q21-q24 (4); 3q25-q26.1 (3)
4	4q24-q26 (3); 4q34 (3)	4p14 (3); 4p15.1 (4); 4p15.2 (3); 4p15.3 (4); 4p16 (3)
5	-	5p14-p15.3 (3); 5q11.2-q14 (4); 5q15 (3); 5q21 (4); 5q23 (4); 5q31 (5); 5q33 (3); 5q34 (4)
6	-	6p12-p21.1 (3); 6p21.3 (4); 6p22 (5); 6p23-p25 (3); 6q14 (3); 6q16-q22 (4); 6q23 (5); 6q24-q25 (6); 6q26-q27 (4)
7	-	7p11.2 (3); 7p12-p13 (5); 7p14-p15 (4); 7p21-p22 (5); 7q11.2-q22 (4); 7q31 (6); 7q32-q34 (3); 7q35-q36 (4)
8	8p22-p23 (3); 8q21.3-q22 (3)	8p11.2-p12 (4); 8p22 (3); 8q11.2-q12 (3); 8q23 (4)
9	-	9p12-p21 (6); 9p22-p23 (4); 9q21-q22 (6); 9q31-q34 (5)
10	-	10p11.2-p12 (4); 10p13-p15 (3); 10q11.2-q22 (5); 10q24 (3); 10q25-q26 (4)
11	11p12 (3); 11p14 (3)	11p11.2 (5); 11p12 (3); 11p14-p15 (4); 11q12-q14 (3); 11q23 (4); 11q24-q25 (3)
12	12q14-q15 (4)	12p11.2 (3); 12p12-p13 (4); 12q21 (3); 12q22 (4); 12q23 (3); 12q24.1-q24.2 (4); 12q24.3 (3)
13	13q14 (3)	13q21-q22 (4)
14	-	14q11.2 (3); 14q12 (5); 14q13 (6); 14q21-q23 (5); 14q24 (6); 14q31-q32 (4)
15	-	15q13-q14 (3); 15q15 (6); 15q21-q25 (4); 15q26 (3)
16	-	16p11.2 (5); 16p12-p13.1 (5); 16p13.2 (4); 16p13.3 (3); 16q12.1-q13 (5); 16q21-q22 (4); 16q23 (5); 16q24 (3)
17	-	17p11.2-p12 (5); 17q11.2-q21 (4)
18	-	18p11.2 (5); 18p11.3 (4); 18q11.2 (3); 18q12-q21 (4)
19	-	19q13.1 (3); 19q13.2-q13.3 (4); 19q13.4 (3)
20	-	20p12 (3); 20q11.2-q12 (5); 20q13.1-q13.3 (4)
21	-	21q21 (3); 21q22 (4)
22	-	22q12-q13 (4)
X	-	Xp11.2 (3); Xp11.4-p21 (4); Xp22.1-p22.2 (3); Xq12-q21 (5); Xq25 (3);
Y	-	Yq11.2 (4)

Amostras incluídas na análise: CXAP1, CXAP2, CXAP3, CXAP4, CXAP5 e CXAP6. Entre parêntesis está o número de casos em que foi detectada a alteração genômica.

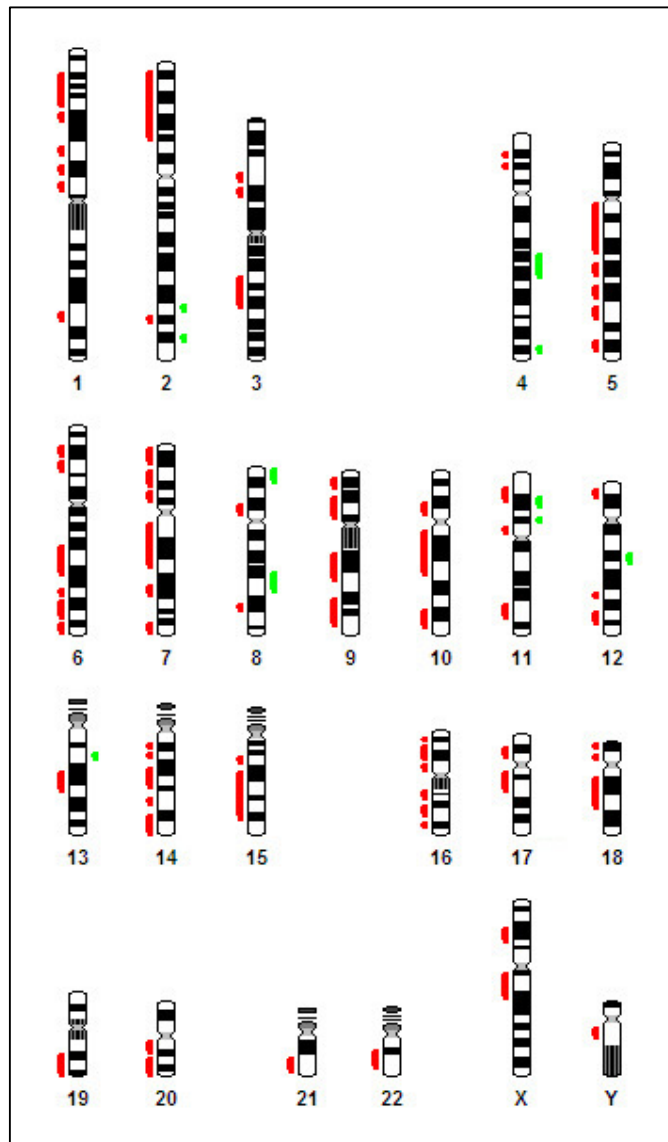


Figura 7. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais frequentes entre as seis amostras FFEP de CXAP identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

Entre os cinco CAC a fresco analisados, os **ganhos** mais freqüentes (presentes em mais de 40% dos casos) envolveram 1p12-p13, 1q21-q22, 2p11.2-p12, 2q11.2-q13, 2q14.1, 3p12, 3q13.1-q13.3, 4q21-q22, 4q24, 5q11.2, 5q12, 7q11.2, 10q21; e as **perdas** (presentes em mais de 60% dos casos) 1p36.2-p36.3, 1q32-q44, 2p21-p22, 2p23-p24, 2q32-q33, 2q34, 2q35-q36, 2q37, 3p21-p23, 3q24-q25, 3q26.1-q29, 4p15.1-p15.3, 4q31.1, 4q32, 4q33-q35, 5p14-p15.1, 5p15.2-p15.3, 5q31-q34, 6p22-p23, 6q22-q23, 6q24, 6q25-q27, 7p15-p21, 7q31, 7q32-q36, 8p22, 8q23, 8q24.1, 9p13-p21, 9p23-p24, 9q22-q31, 9q33-q34, 11p12-p13, 11p14-p15, 11q23-q25, 12q21, 12q22-q23, 12q24.1, 13q21-q22, 13q31-q32, 13q33, 13q34, 14q23-q24, 14q31-q32, 15q21, 15q24-q25, 15q26, 16p12-p13.1, 16q12.1-q12.2, 16q13-q22, 16q23-q24, 17p11.2, 17p12, 17p13, 17q24-q25, 18p11.2, 18q11.2-q13, 20p12-p13, 20q11.2-q12, 21q21, 21q22, 22q11.2-q13, Xp21-p22.1, Xq22-q24, Xq25 (5) e Xq26-q28 (**Tabela 5, Figura 8**).

Foram observadas regiões mínimas comuns consistentes entre o caso FFEP de CAC e o grupo de CAC a fresco, envolvendo **perdas** em 1q32-q44, 2p16-p22, 2p23-p24, 2q33-q35, 3p21-p22, 3q24-q25, 3q26.3, 4q31.1, 4q33-q34, 5p14, 5q31-q34, 6q25, 7p14-p21, 7q22, 7q31-q36, 8p21-p22, 8q23-q24.1, 9q22-q31, 9q34, 10q23-q26, 11q23, 12q22-q23, 13q22-q31, 14q24, 16q22, 19q13.4, 21q22, 22q13, Xp21-p22.1, Xp22.2, Xq23 e Xq27 (destacadas na **Tabela 5**). Não foram observados **ganhos** em comum nestes dois grupos.

Tabela 5. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas em um caso de carcinoma adenóide cístico (CAC) em parafina e cinco amostras a fresco.

		Ganhos	Perdas	Ganhos	Perdas
1	-		1q32; 1q43-q44	1p12-p13 (3); 1q21-q22 (4)	1p36.2-p36.3 (3); 1q31 (2); 1q32-q44 (5)
2	-		2p12-p16; 2p16-p22; 2p23-p24; 2q13-q22; 2q23-q24; 2q31; 2q33-q35	2p11.2-p12 (3); 2q11.2-q13 (4); 2q14.1 (3)	2p16-p21 (2); 2p21-p22 (4); 2p23-p24 (5); 2p25 (2); 2q32-q33 (4); 2q34 (5); 2q35-q36 (4); 2q37 (5)
3	-		3p21-p22; 3q23; 3q24-q25; 3q26.3	3p12 (2); 3q13.1-q13.3 (4)	3p21-p23 (3); 3p24-p25 (2); 3q24-q25 (4); 3q26.1-q29 (5)
4	-		4p16; 4q22-q26; 4q28-q31.1; 4q33-q34	4q21-q22 (3); 4q24 (2)	4p14 (2); 4p15.1-p15.3 (3); 4q31.1 (3); 4q32 (5); 4q33-q35 (4)
5	-		5p13-p14; 5q22; 5q31; 5q34-q35	5q11.2 (3); 5q12 (2)	5p14-p15.1 (5); 5p15.2-p15.3 (3); 5q31-q34 (4)
6	-		6q25	-	6p22-p23 (3); 6p24 (2); 6q22-q23 (5); 6q24 (4); 6q25-q27 (5)
7	-		7p14-p15; 7p15; 7p21-p22; 7q11.2; 7q22; 7q31; 7q31-q36	7q11.2 (4)	7p14 (2); 7p15-p21 (3); 7q21-q22 (2); 7q31 (4); 7q32-q36 (5)
8	-		8p21-p22; 8q13; 8q23-q24.1	-	8p21 (2); 8p22 (3); 8p23 (2); 8q23 (5); 8q24.1 (3); 8q24.2-q24.3 (2)
9	-		9q22-q31; 9q32-q34	-	9p13-p21 (3); 9p23-p24 (3); 9q22-q31 (3); 9q33-q34 (4)
10	-		10q21; 10q23-q24; 10q24-q25; 10q26	10q21 (2)	10q23-q26 (2)
11	-		11q12-q13; 11q23	-	11p12-p13 (3); 11p14-p15 (4); 11q23-q25 (4)
12	-		12q22-q23; 12q24.3	-	12p12-p13 (2); 12q21 (4); 12q22-q23 (5); 12q24.1 (4); 12q24.2 (2)
13	-		13q22-q31	-	13q12-q14 (2); 13q21-q22 (5); 13q31-q32 (4); 13q33 (5); 13q34 (4)
14	-		14q21; 14q24	-	14q22 (2); 14q23-q24 (4); 14q31-q32 (3)
15	-		-	-	15q14-q15 (2); 15q21 (3); 15q22 (2); 15q24-q25 (3); 15q26 (4)
16	-		16p11.2-p13.2; 16q22; 16q23-q24	-	16p12-p13.1 (3); 16p13.2 (2); 16q12.1-q12.2 (3); 16q13-q22 (4); 16q23-q24 (5)
17	-		-	-	17p11.2 (5); 17p12 (4); 17p13 (3); 17q23 (2); 17q24-q25 (5)
18	-		18p11.3; 18q22-q23	-	18p11.2 (4); 18q11.2-q13 (4)
19	-		19p13.1-p13.3; 19p13.2; 19q13.4	-	19q13.2-q13.4 (2)
20	-		-	-	20p12-p13 (3); 20q11.2-q12 (3); 20q13.1 (2)

21	-	21q22	-	21q21 (4); 21q22 (5)
22	-	22q13	-	22q11.2-q13 (4)
X	-	Xp11.3-p11.4; Xp21-p22.1 ; Xp22.1-p22.3 ; Xq13; Xq23 ; Xq27	-	Xp21-p22.1 (3); Xp22.2 (2); Xq22-q24 (3); Xq25 (5); Xq26-q28 (4)
Y	-	Yp11.2	-	Yp11.2 (2); Yq11.2 (2)

A amostra FFEP refere-se ao CAC1 e amostras à fresco aos casos CAC1F, CAC2F, CAC3F, CAC4F e CAC5F. Entre parêntesis está o número de casos em que foi detectada a alteração genômica.

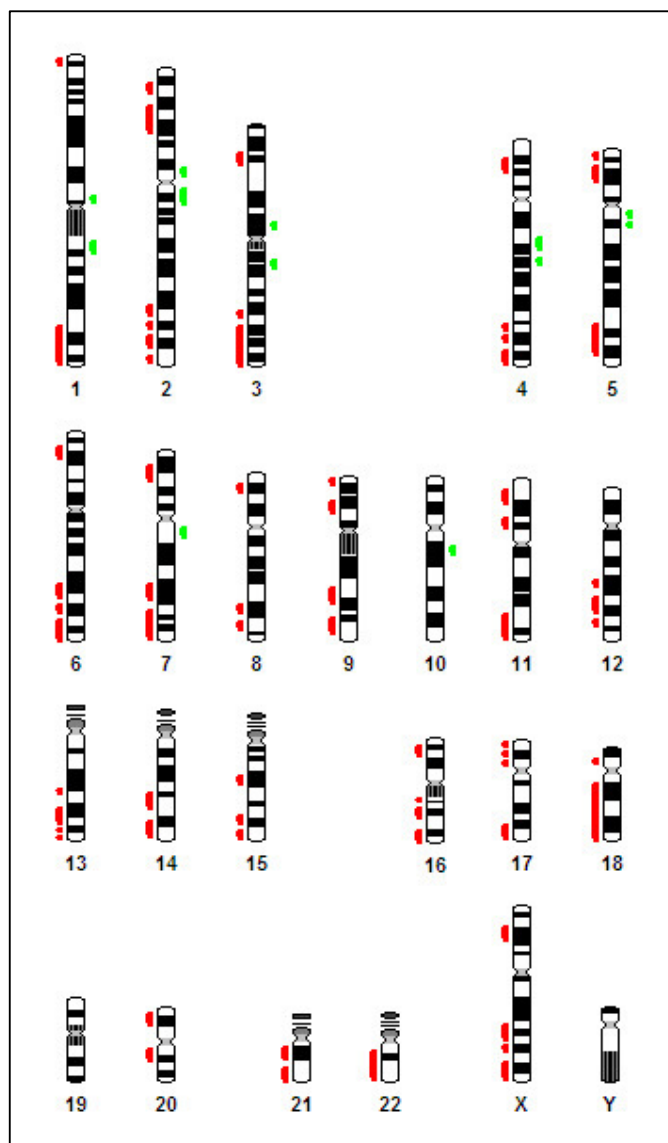


Figura 8. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais frequentes entre as cinco amostras a fresco de CAC identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

Entre os quatro casos de CME a fresco analisados, os **ganhos** mais frequentes (presentes em mais de 50% dos casos) envolveram 1p31, 1q23-q25, 10q11.2-q21 e 12q13; e as **perdas** (presentes em mais de 75% dos casos) 2p22-p23, 2q32, 2q34-q37, 3q24, 3q26.1-q26.3, 3q27-q28, 3q29, 4q32-q35, 6q16-q21, 6q23, 6q24-q27, 7q31, 7q34-q35, 7q36, 8q23,

11p14, 11q23-q24, 13q21-q22, 13q31, 13q32-q34, 15q14, 16q12.1-q24, 18q11.2-q12, 18q21-q22, 18q23, 20q12-q13.1, 21q11.2, 21q21-q22 e 22q11.2-q13 (**Tabela 6, Figura 9**).

Tabela 6. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as quatro amostras a fresco de carcinomas mucoepidermóides (CME).

Cromossomos	CME à fresco (casos)	
	Ganhos	Perdas
1	1p31 (3); 1q23-q25 (2)	1q32-q41 (2)
2	-	2p16-p21 (2); 2p22-p23 (3); 2q32 (3); 2q34-q37 (3)
3	-	3p22 (2); 3q24 (3); 3q25 (2); 3q26.1-q26.3 (4); 3q27-q28 (3); 3q29 (4)
4	-	4p14-p15.1 (2); 4q32-q35 (3)
5	-	5p14-p15.2 (2); 5q32-q34 (2)
6	-	6q16-q21 (3); 6q22 (2); 6q23 (4); 6q24-q27 (3)
7	-	7q31 (3); 7q32-q33 (2); 7q34-q35 (3); 7q36 (4)
8	-	8q12-q13 (2); 8q21.3-q22 (2); 8q23 (3)
9	-	9q22-q31 (2)
10	10q11.2-q21 (2)	-
11	-	11p13 (2); 11p14 (3); 11p15 (2); 11q23-q24 (3); 11q25 (2)
12	12q13 (2)	12q21 (2); 12q24.3 (2)
13	-	13q21-q22 (4); 13q31 (3); 13q32-q34 (4)
14	-	14q24-q31 (2)
15	-	15q12-q13 (2); 15q14 (3); 15q15-q22 (2); 15q24-q26 (2)
16	-	16q12.1-q24 (3)
17	-	17q11.2-q12 (2); 17q24-q25 (2)
18	-	18q11.2-q12 (3); 18q21-q22 (4); 18q23 (3)
19	-	-
20	-	20p11.2-p12 (2); 20q11.2 (2); 20q12-q13.1 (3); 20q13.2-q13.3 (2)
21	-	21q11.2 (3); 21q21-q22 (4)
22	-	22q11.2-q13 (3)
X	-	Xq25-q26 (2)
Y	-	Yp11.2 (2)

Amostras incluídas na análise: CME1F, CME2F, CME3F e CME4F. Entre parêntesis está o número de casos em que foi detectada a alteração genômica.

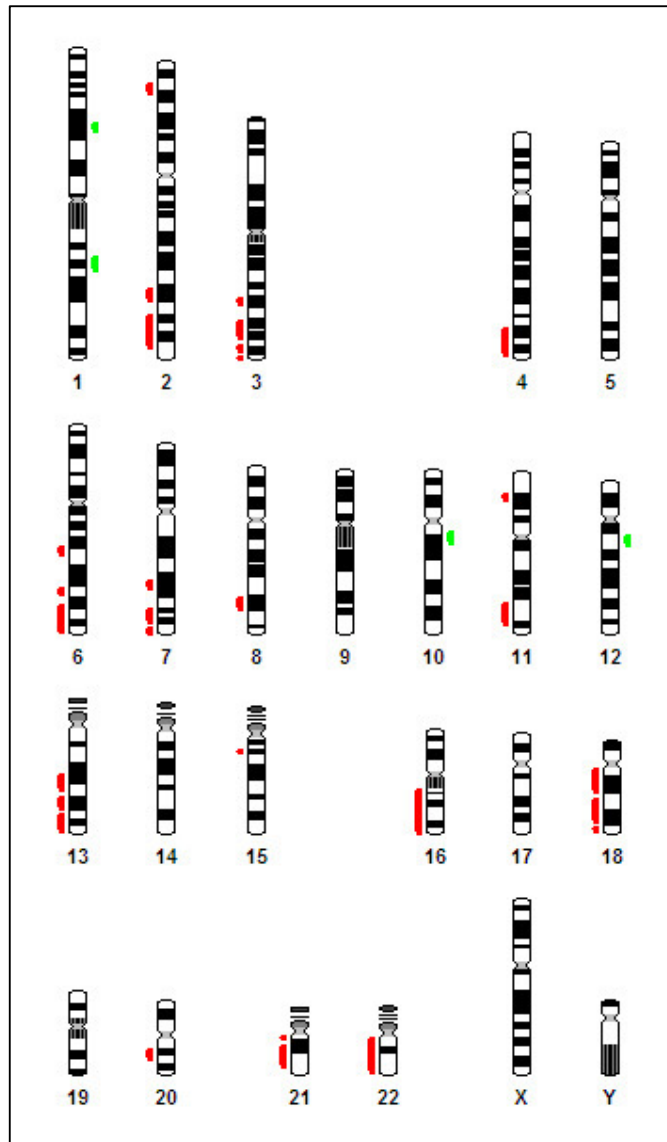


Figura 9. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais frequentes entre as quatro amostras a fresco de CME identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

Entre os três ACAR a fresco foram observados **ganhos** frequentes (presentes em ~70% dos casos) em 1p13 e 1p34.2-p35; e as **perdas** (100% dos casos) em 2q34-q36, 3p21-p22, 3q26.1-q26.2, 4q32, 6q21, 9q34, 13q21-q31, 15q25-q26, 16q24, 18q12-q22, 20p12, 20q12-q13.3, 21q11.2-q22 e Xq25-q26 (**Tabela 7, Figura 10**).

Tabela 7. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as três amostras a fresco de adenocarcinomas (ACAR).

Cromossomos	ACAR à fresco (casos)	
	Ganhos	Perdas
1	1p13 (2); 1p34.2-p35 (2)	1q41 (2)
2	-	2q32-q33 (2); 2q34-q36 (3)
3	-	3p21-p22 (3); 3p23-p24 (2); 3q24-q25 (2); 3q26.1-q26.2 (3); 3q26.3-q29 (2)
4	-	4q32 (3)
5	-	5p14-p15.2 (2)
6	-	6q15-q16 (2); 6q21 (3); 6q22-q23 (2)
7	-	7q35-q36 (2)
8	-	8q22 (2)
9	-	9p21-p24 (2); 9q33 (2); 9q34 (3)
10	-	-
11	-	11p14 (2); 11q23 (2)
12	-	12p12 (2)
13	-	13q21-q31 (3); 13q32-q33 (2)
14	-	14q22-q23 (2)
15	-	15q14-q15 (2); 15q21-q22 (2); 15q24 (2); 15q25-q26 (3)
16	-	16q22-q23 (2); 16q24 (3)
17	-	17p11.2-p12 (2); 17q24-q25 (2)
18	-	18p11.2 (2); 18q11.2 (2); 18q12-q22 (3); 18q23 (2)
19	-	-
20	-	20p12 (3); 20p13 (2); 20q11.2 (2); 20q12- q13.3 (3)
21	-	21q11.2-q22 (3)
22	-	22q12-q13 (2)
X	-	Xp21-p22.1 (2); Xq24 (2); Xq25-q26 (3)
Y	-	-

Amostras incluídas na análise: ACAR1F, ACAR2F e ACAR3F. Entre parêntesis está o número de casos em que foi detectada a alteração genômica.

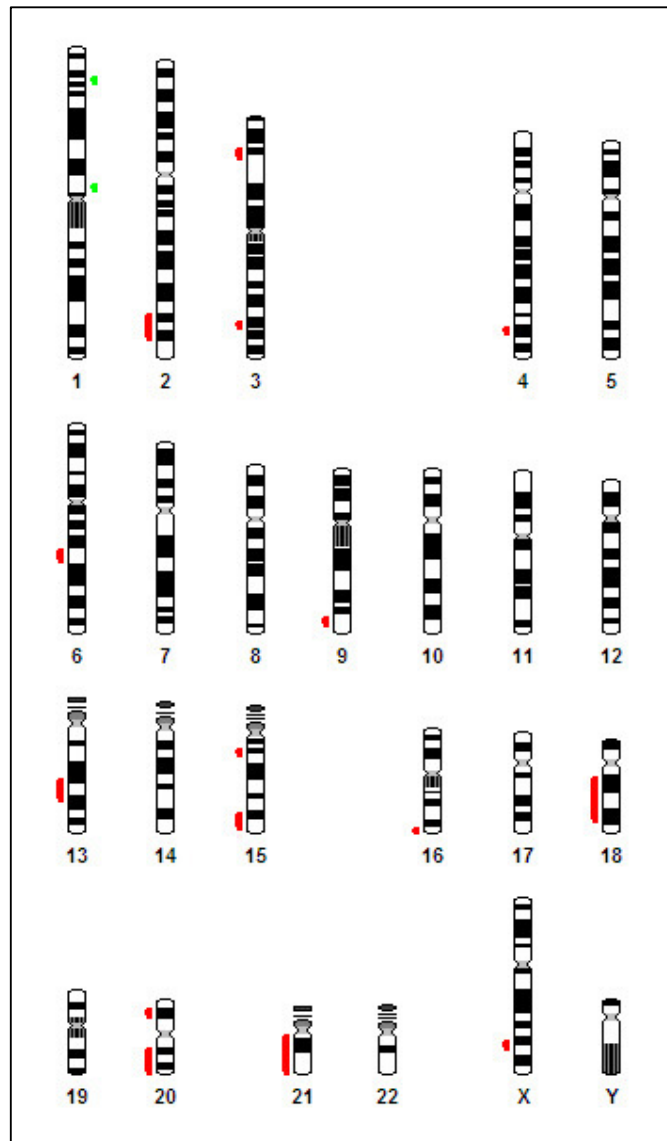


Figura 10. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas mais frequentes entre as três amostras a fresco de ACAR identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

Os três CDS FFEP apresentaram **ganhos** comuns (100% dos casos) em 3q31, 4p12-p13, 4q12-q13, 7q11.2 e 9p12-p13; e **perdas** comuns (100% dos casos) em 1p31-p32, 1p34.1-p34.2, 1q41, 2p13-p14, 2p22-p25, 2q36-q37, 3p24-p26, 3q26.3-q29, 4q34, 5q35, 6p21.3-p25, 6q27, 7p15-p22, 7q34-q36, 8p11.2-p12, 8q22, 8q24.1, 9q22-q31, 9q34, 10q25-q26, 11p15, 11q24-q25, 12p12-p13, 12q21-q24.3, 13q32-q33, 14q23-q32, 15q22, 15q25-q26, 16p11.2-

p13.3, 16q22-q24, 17p12-p13, 17q21-q25, 18q22-q23, 19p13.1-p13.3, 19q13.2-q13.4, 20q11.2-q13.3, 21q22, 22q11.2-q13 e Xq21 (**Tabela 8, Figura 11**).

Tabela 8. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas nas três amostras FFEP de carcinomas ductais salivares (CDS).

Cromossomos	CDS parafinados	
	Ganhos	Perdas
1	-	1p31-p32; 1p34.1-p34.2; 1q41
2	-	2p13-p14; 2p22-p25; 2q36-q37
3	3q13.1	3p24-p26; 3q26.3-q29
4	4p12-p13; 4q12-q13	4q34
5	-	5q35
6	-	6p21.3-p25; 6q27
7	7q11.2	7p15-p22; 7q34-q36
8	-	8p11.2-p12; 8q22; 8q24.1
9	9p12-p13	9q22-q31; 9q34
10	-	10q25-q26
11	-	11p15; 11q24-q25
12	-	12p12-p13; 12q21-q24.3
13	-	13q32-q33
14	-	14q23-q32
15	-	15q22; 15q25-q26
16	-	16p11.2-p13.3; 16q22-q24
17	-	17p12-p13; 17q21-q25
18	-	18q22-q23
19	-	19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.4
20	-	20q11.2-q13.3
21	-	21q22
22	-	22q11.2-q13
X	-	Xq21
Y	-	-

Amostras incluídas na análise: CDS2, CDS3 e CDS5.

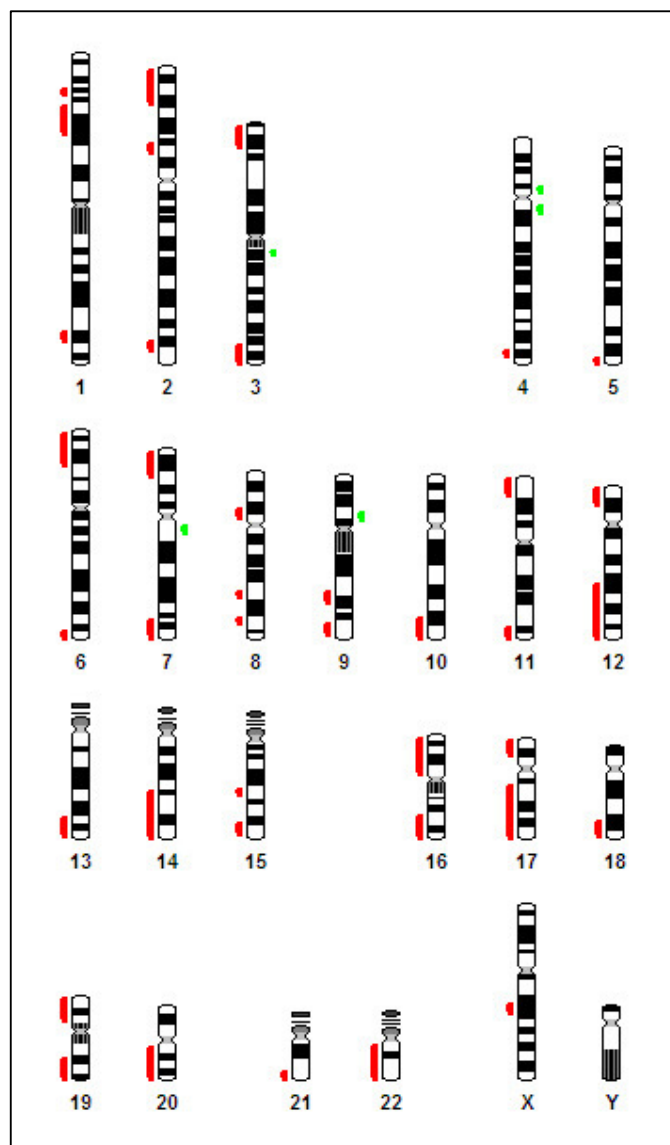


Figura 11. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas nas três amostras FFEP de CDS identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

Entre os dois oncocitomas FFEP foram observadas **perdas** comuns (100% dos casos) em 1p32-p34.2, 1p35-p36.1, 1p36.2-p36.3, 1q24-q31, 1q42-q43, 2p13-p14, 2p24, 3q24-q25, 3q26.3-q27, 4p15.1-p15.3, 4q34-q35, 5p15.1-p15.2, 5q21, 5q32-q35, 6p22, 7q11.2, 8p11.2-p12, 8q23-q24.3, 9p13, 9q31-q33, 10p11.2-p12, 10q11.2-q21, 10q24-q26, 11p12-p13, 11q14, 11q22-q23, 13q13-q14, 13q21-q31, 13q32-q33, 14q31-q32, 15q12-q14, 16p11.2-p13.3,

16q21-q24, 18p11.2-p11.3, 18q22-q23, 19p13.1-p13.3, 21q21-q22 e 22q11.2-q13. Não foram observados **ganhos** comuns nestes dois casos. (**Tabela 9, Figura 12**).

Tabela 9. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas entre as duas amostras parafinadas de oncocitomas (ON).

Cromossomos	ON parafinados	
	Ganhos	Perdas
1	-	1p32-p34.2; 1p35-p36.1; 1p36.2-p36.3; 1q24-q31; 1q42-q43
2	-	2p13-p14; 2p24
3	-	3q24-q25; 3q26.3-q27
4	-	4p15.1-p15.3; 4q34-q35
5	-	5p15.1-p15.2; 5q21; 5q32-q35
6	-	6p22
7	-	7q11.2
8	-	8p11.2-p12; 8q23-q24.3
9	-	9p13; 9q31-q33
10	-	10p11.2-p12; 10q11.2-q21; 10q24-q26
11	-	11p12-p13; 11q14; 11q22-q23
12	-	-
13	-	13q13-q14; 13q21-q31; 13q32-q33
14	-	14q31-q32
15	-	15q12-q14
16	-	16p11.2-p13.3; 16q21-q24
17	-	-
18	-	18p11.2-p11.3; 18q22-q23
19	-	19p13.1-p13.3
20	-	-
21	-	21q21-q22
22	-	22q11.2-q13
X	-	-
Y	-	-

Amostras incluídas na análise: ON1 e ON2.

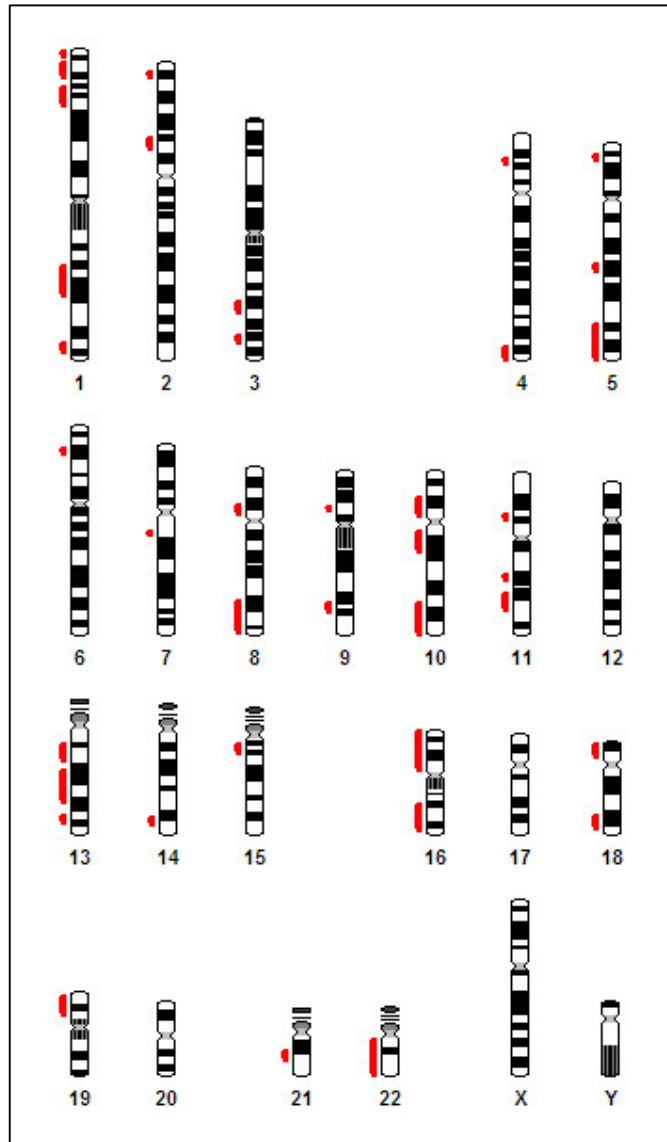


Figura 12. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas nas duas amostras FPEP de ON identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

Os dois casos de CEM fixados e em blocos de parafina analisados apresentaram **ganho** comum (100% dos casos) em 4q23-q24; e **perdas** (100% dos casos) em 1p22-p33, 1p35-p36.1, 1q24-q25, 1q42-q44, 2p14-p15, 2p22-p24, 2q32-q36, 2q37, 3p25-p26, 3q24, 4p15.3-p16, 4q31.1-q31.2, 4q32, 5q34-q35, 6p22, 6q16, 6q21, 6q22-q23, 6q24-q27, 7p13-

p15, 7q31, 7q32-q36, 8p12-p21, 8p22-p23, 9p12, 9p13-p21, 9q22-q34, 10q11.2-q21, 10q22, 10q24-q26, 11q22-q23, 12q22, 12q24.3, 14q22-q24, 14q32, 15q21, 15q22-q26, 16q12.1-q24, 17q11.2-q25, 18p11.2-p11.3, 18q12-q21, 18q21-q23, 19p13.1-p13.2, 19q13.1-q13.3, 20p11.2, 20p12-p13, 20q11.2-q12, 20q13.1-q13.3, Xq22-q24, Xq27-q28 e Yq11.2 (**Tabela 10, Figura 13**).

Tabela 10. Regiões mínimas comuns de perdas e ganhos genômicos observadas nas duas amostras de carcinomas epiteliais mioepiteliais (CEM).

Cromossomos	CEM à fresco	
	Ganhos	Perdas
1	-	1p22-p33; 1p35-p36.1; 1q24-q25; 1q42-q44
2	-	2p14-p15; 2p22-p24; 2q32-q36; 2q37
3	-	3p25-p26; 3q24
4	4q23-q24	4p15.3-p16; 4q31.1-q31.2; 4q32
5	-	5q34-q35
6	-	6p22; 6q16; 6q21; 6q22-q23; 6q24-q27
7	-	7p13-p15; 7q31; 7q32-q36
8	-	8p12-p21; 8p22-p23
9	-	9p12; 9p13-p21; 9q22-q34
10	-	10q11.2-q21; 10q22; 10q24-q26
11	-	11q22-q23
12	-	12q22; 12q24.3
13	-	-
14	-	14q22-q24; 14q32
15	-	15q21; 15q22-q26
16	-	16q12.1-q24
17	-	17q11.2-q25
18	-	18p11.2-p11.3; 18q12-q21; 18q21-q23
19	-	19p13.1-p13.2; 19q13.1-q13.3
20	-	20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q12; 20q13.1-q13.3
21	-	-
22	-	-
X	-	Xq22-q24; Xq27-q28
Y	-	Yq11.2

Amostras incluídas na análise: CEM1 e CEM2.

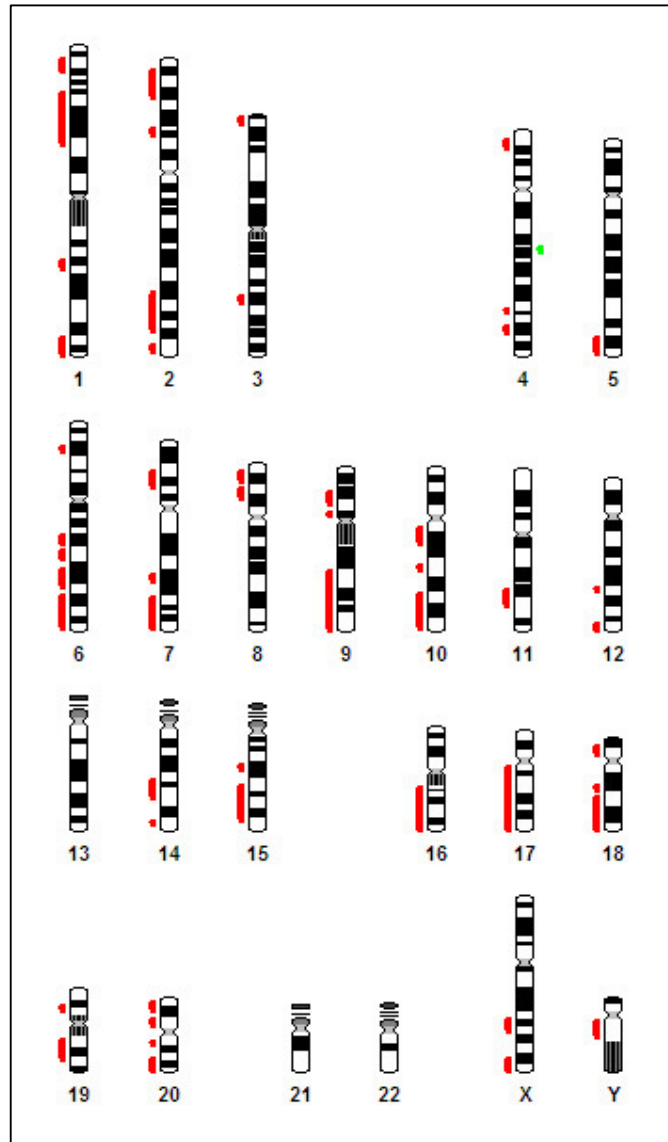


Figura 13. Ideograma representativo das regiões mínimas comuns alteradas nas duas amostras de CEM identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$). As barras à esquerda indicam perdas (vermelho) e à direita indicam ganhos (verde).

2. Seleção de genes candidatos

Foi feita a busca de genes candidatos mapeados nas regiões preferencialmente alteradas detectadas pela HR-CGH nos dois tipos tumorais com maior grupo amostral (adenomas pleomórficos e tumores de Warthin) para posterior avaliação da expressão gênica e protéica. Foi utilizado o banco de dados do *Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) que permite a busca de regiões genômicas de interesse para cada cromossomo humano e os respectivos genes mapeados nestas regiões. Os critérios para seleção destes genes foram associação entre a função e o tipo de alteração encontrada nas amostras estudadas e dados em literatura relacionados ao câncer ou estudos prévios em TSG. Os **anexos 6 e 7** apresentam a lista de genes mapeados nas regiões alteradas entre os dois tipos de tumores estudados.

Foram selecionados alguns genes para os adenomas pleomórficos mapeados em regiões de ganhos genômicos freqüentemente detectadas pela HR-CGH para serem avaliados por RT-PCR quantitativa em tempo real para análise de expressão de transcritos. O gene *NEDD9* (6p24-p25) foi selecionado como possível candidato em AP pelo fato da região em que se mapeia ter sido detectada em ganhos em 8/27 AP. Da mesma forma, os genes *PPARG* (3p25) e *c-MYC* (8q24.21) foram selecionados para análise de expressão gênica pois as regiões em que se mapeiam estavam envolvidas em ganhos em 6/26 e 3/27 AP, respectivamente.

Para os tumores de Warthin foram selecionados as proteínas **CDH1** (16q22.1) e **HRK** (12q24.22) cujos genes estão mapeados em regiões freqüentemente deletadas identificadas pela HR-CGH. A análise da expressão protéica foi realizada por imuno-histoquímica.

3. Análise de expressão dos transcritos *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* em Adenomas Pleomórficos

O nível de expressão dos genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* foi avaliado pela qRT PCR em tempo real em três amostras de tecidos normais de glândulas salivares e 36 amostras de adenomas pleomórficos, destas seis amostras foram previamente utilizadas na análise de HR-CGH.

As **Figuras 14 e 15** representam as curvas de amplificação e dissociação para os genes *NEDD9*, *PPARG*, *c-MYC* e *HPRT* (endógeno), respectivamente. A **Tabela 11** apresenta os resultados da avaliação da expressão por qRT-PCR dos genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* e do endógeno *HPRT* nas amostras de adenomas pleomórficos comparadas com tecidos normais de glândulas salivares. Os valores das quantificações relativas finais foram obtidos pelo valor médio das amplificações das amostras normais em todas as placas analisadas. O intervalo de confiança para o gene *NEDD9* foi de 0,60 a 1,56 (desvio-padrão: 0,48); para o gene *PPARG* foi de 0,50 a 1,74 (desvio-padrão: 0,62); e para o gene *c-MYC* foi de 0,59 a 1,64 (desvio-padrão: 0,53). Estes valores de QR para cada gene foram utilizados como limiares para considerar diminuição e aumento de expressão, respectivamente.

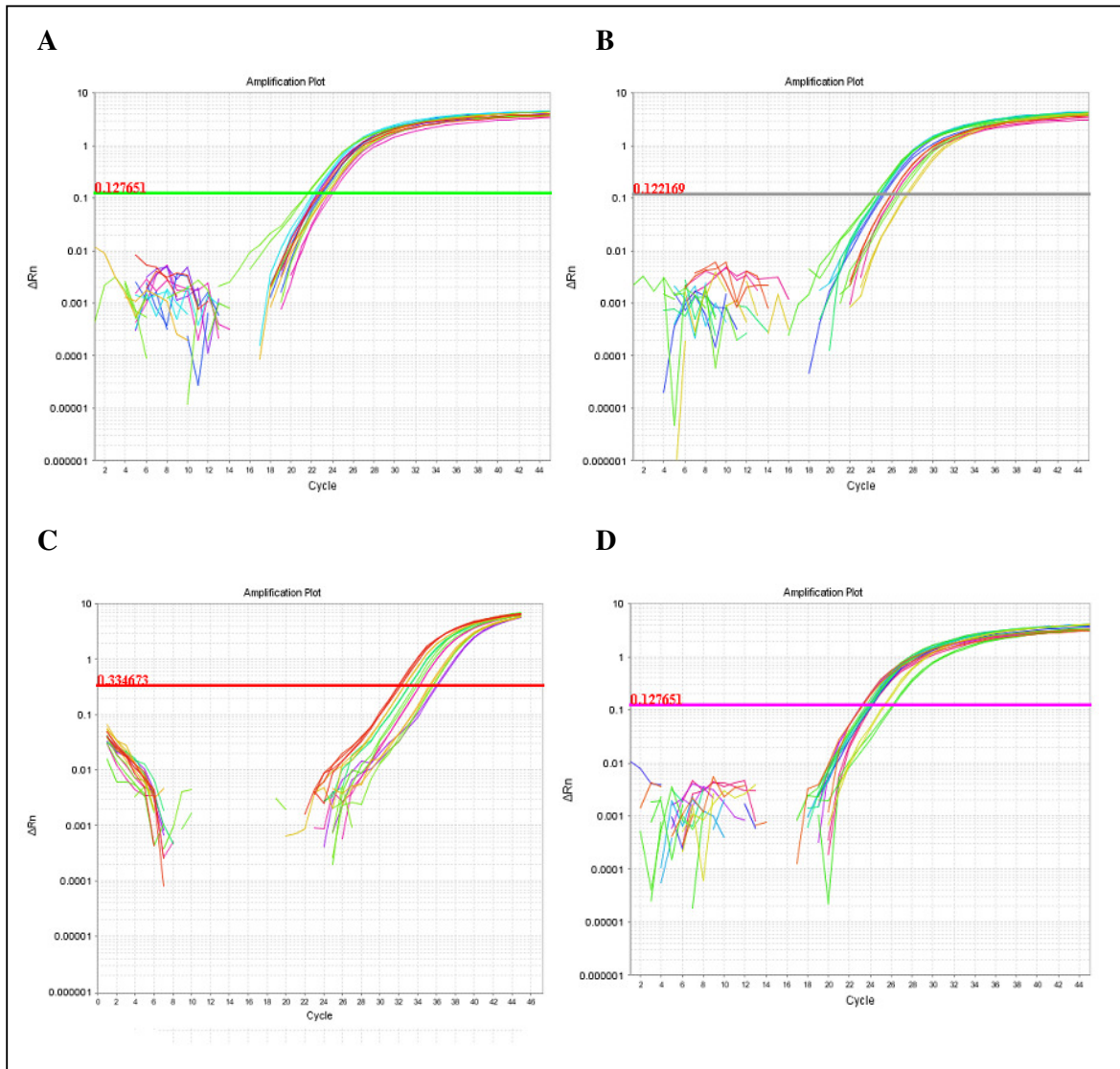


Figura 14. Curvas de amplificação para os genes alvos *NEDD9* (A), *PPARG* (B), *c-MYC* (C) e para o endógeno *HPRT* (D).

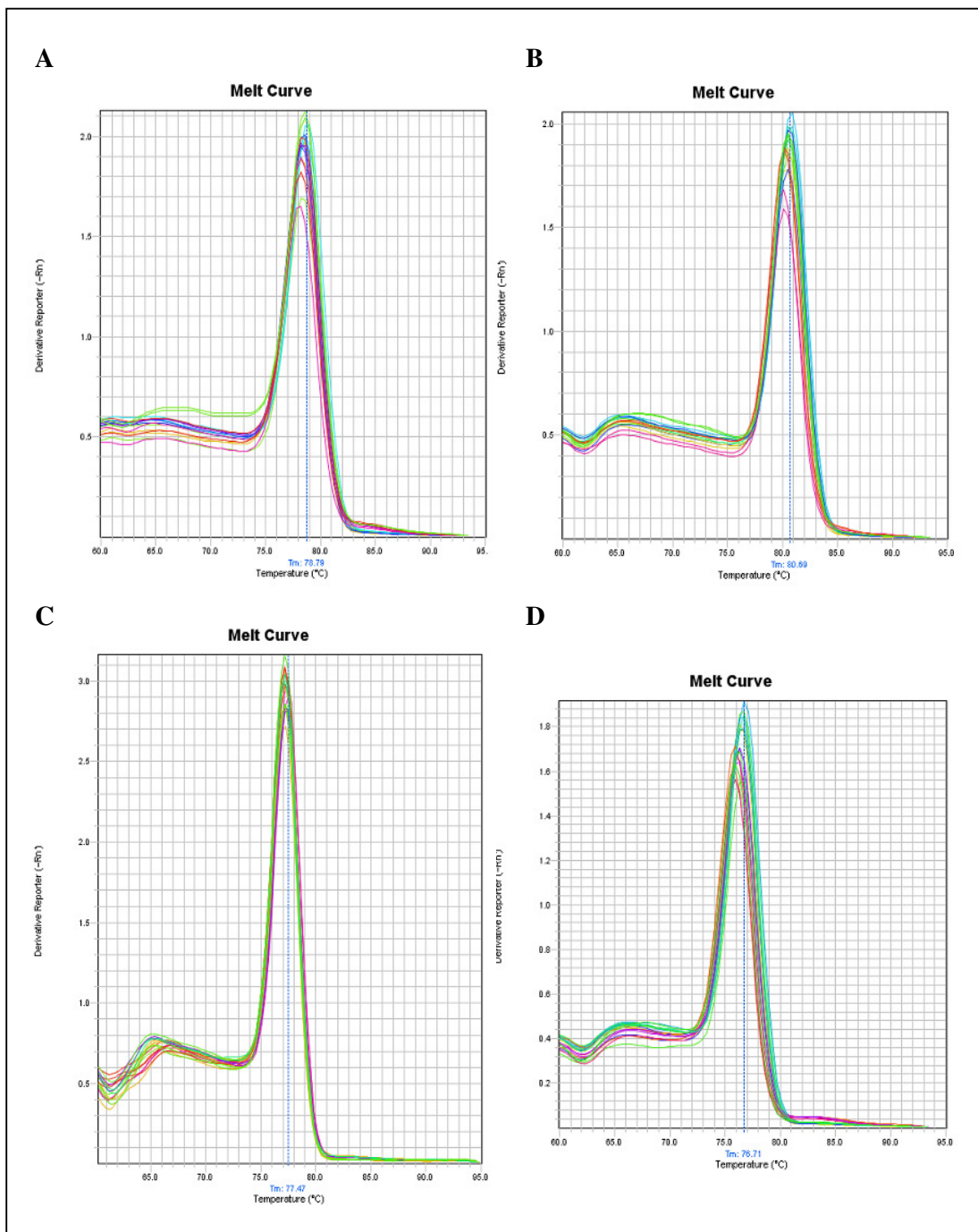


Figura 15. Curvas de dissociação para os genes alvos *NEDD9* (A), *PPARG* (B), *c-MYC* (C) e para o endógeno *HPRT* (D). A presença de um pico único para cada amostra indica a amplificação somente do produto de interesse de cada gene.

Tabela 11. Resultados da avaliação da expressão por qRT-PCR em tempo real dos genes alvos *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* e do endógeno *HPRT* em amostras de adenomas pleomórficos (AP) comparadas com amostras de tecidos normais de glândulas salivares.

Caso	<i>NEDD9</i> MCt	<i>HPRT</i> MCt	<i>PPARG</i> MCt	<i>HPRT</i> MCt	<i>c-MYC</i> MCt	<i>HPRT</i> MCt	<i>NEDD9</i> QR	<i>PPARG</i> QR	<i>c-MYC</i> QR
2T	21,72	23,11	22,78	23,11	31,95	34,93	1,47	2,04	2,92
3T	25,91	29,81	29,53	29,81	-	-	8,40	1,96	-
5T	27,70	27,19	28,70	27,19	32,04	34,45	0,39	0,57	1,96
7T	25,19	27,86	30,31	27,86	-	-	3,57	0,30	-
10T	24,68	26,55	26,34	26,55	37,13	40,58	2,05	1,86	4,04
12T	21,67	23,81	24,25	23,81	31,52	35,88	2,47	1,19	7,60
14T	23,26	24,34	25,94	24,34	33,66	35,54	1,18	0,53	1,36
17T	29,83	31,02	32,19	31,02	-	-	1,28	0,72	-
18T	21,63	22,50	24,78	22,50	32,06	35,26	1,03	0,33	3,40
19T	24,73	26,98	28,85	26,98	38,39	43,45	2,68	0,44	12,38
20T	25,94	27,44	29,45	27,44	-	-	1,59	0,40	-
21T	24,97	23,97	24,95	23,97	37,11	39,59	0,28	0,82	2,07
24T	25,17	23,71	24,83	23,71	35,69	39,64	0,20	0,75	5,71
27T	21,96	23,49	25,02	23,49	35,58	37,33	1,62	0,56	1,25
28T	34,56	34,21	38,85	34,21	-	-	0,44	0,06	-
31T	24,27	25,39	26,79	25,39	35,33	39,79	1,22	0,61	8,17
32T	24,70	24,93	27,83	24,93	35,61	39,90	0,66	0,22	7,22
36T	22,33	23,03	24,25	23,03	37,44	39,62	0,92	0,70	1,68
38T	25,27	26,25	27,39	26,25	37,58	40,81	1,11	0,73	3,46
39T	22,12	26,02	26,57	26,02	34,77	41,01	8,38	1,10	28,15
40T	28,80	30,68	32,08	30,68	-	-	2,07	0,61	-
41T	22,27	26,51	27,54	26,51	39,01	42,74	10,55	0,79	4,91
42T	21,13	21,23	24,09	21,23	31,94	34,54	0,60	0,22	2,24
44T	20,77	20,95	24,93	20,95	32,62	34,29	0,64	0,10	1,18
46T	34,21	33,59	-	32,22	-	-	0,37	2,10	-
47T	29,89	32,22	31,84	21,22	-	-	2,82	0,96	-
50T	18,16	21,22	21,98	36,14	28,33	34,27	4,69	2,32	22,73

53T	31,16	34,24	35,62	24,37	-	-	4,73	1,06	-
54T	21,28	24,37	24,98	25,42	34,16	39,97	4,79	0,37	20,79
AP3F	23,57	25,42	27,57	23,77	33,76	39,14	2,04	0,20	15,47
AP4F	23,47	23,77	26,75	24,05	33,10	36,44	0,69	0,91	3,76
AP5F	20,44	24,05	24,87	23,87	33,60	38,00	6,83	0,79	7,83
AP6F	22,35	23,87	24,91	24,14	32,01	37,35	1,61	0,75	14,95
AP7F	23,05	24,14	25,25	24,39	33,08	36,69	1,19	0,39	4,54
AP8F	22,60	23,18	26,44	24,15	35,76	37,90	0,84	0,37	1,63
AP9F	23,88	24,15	26,29	23,22	35,48	37,75	0,68	0,24	1,78
AP10F	22,81	23,22	25,99	23,11	32,33	36,18	0,75	2,04	5,34
Mediana	23,57	24,37	26,39	24,38	33,96	37,83	1,28	0,66	4,29

(MCt) Média das duplicatas dos Ct de cada amostra; (QR) Quantificação Relativa; (-) Expressão gênica não detectada, mesmo após repetições do experimento. Estão destacados, em **negrito**, os valores diferencialmente expressos em cada amostra, para o gene *NEDD9* foi considerado $QR \geq 1,56$: para expressão aumentada e $QR \leq 0,60$: para expressão diminuída. Para o gene *PPARG* foi considerado $QR \geq 1,74$: para expressão aumentada e $QR \leq 0,50$: para expressão diminuída. E para o gene *c-MYC* foi considerado $QR \geq 1,64$: para expressão aumentada e $QR \leq 0,59$: para expressão diminuída.

Foi observado aumento de expressão dos transcritos *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* em 46%, 14% e 86% dos casos de adenomas pleomórficos, respectivamente, conforme apresentado na **Tabela 12**. A **Figura 16** corresponde à representação gráfica dos níveis de expressão dos transcritos *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* para as amostras de adenomas pleomórficos analisadas (*Prism GraphPad Software 3*). Na comparação entre os níveis de expressão entre casos e controles, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os genes *NEDD9* ($P < 0,0001$); *PPARG* ($P < 0,0001$) e *c-MYC* ($P = 0,0025$). Também foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando foram comparados os casos com expressão normal e expressão aumentada para os genes *NEDD9* ($P < 0,0001$) e *c-MYC* ($P = 0,0062$); e expressão diminuída para o gene *PPARG* ($P < 0,0001$).

Tabela 12. Perfil de expressão dos genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* avaliados para as amostras de adenomas pleomórficos.

Gene	Diminuição	Normal	Aumento
<i>NEDD9</i>	5/37 (14%)	15/37 (41%)	17/37 (46%)
<i>PPARG</i>	13/36 (36%)	18/36 (50%)	5/36 (14%)
<i>c-MYC</i>	-	4/28 (14%)	24/28 (86%)

Para a HR-CGH foram observados ganhos genômicos em 6p24-p25 (*NEDD9*) em 30% dos casos; 3p25 (*PPARG*) em 22% dos casos e 8q24.21 (*c-MYC*) em 11% dos casos de adenomas pleomórficos. Perdas genômicas foram observadas em 22%, 41% e 59% dos casos de AP para as regiões genômicas dos transcritos *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC*, respectivamente.

Seis casos de adenomas pleomórficos analisados pela qRT-PCR em tempo real foram previamente analisados pela HR-CGH, entretanto não houve concordância entre os achados de ganhos genômicos e o aumento de expressão dos transcritos dos genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* (**Tabela 13**). Apenas o caso AP8F apresentava perda da região genômica onde se mapeia o gene *PPARG* (3p25) e diminuição de expressão do transcrito deste gene (QR=0,37).

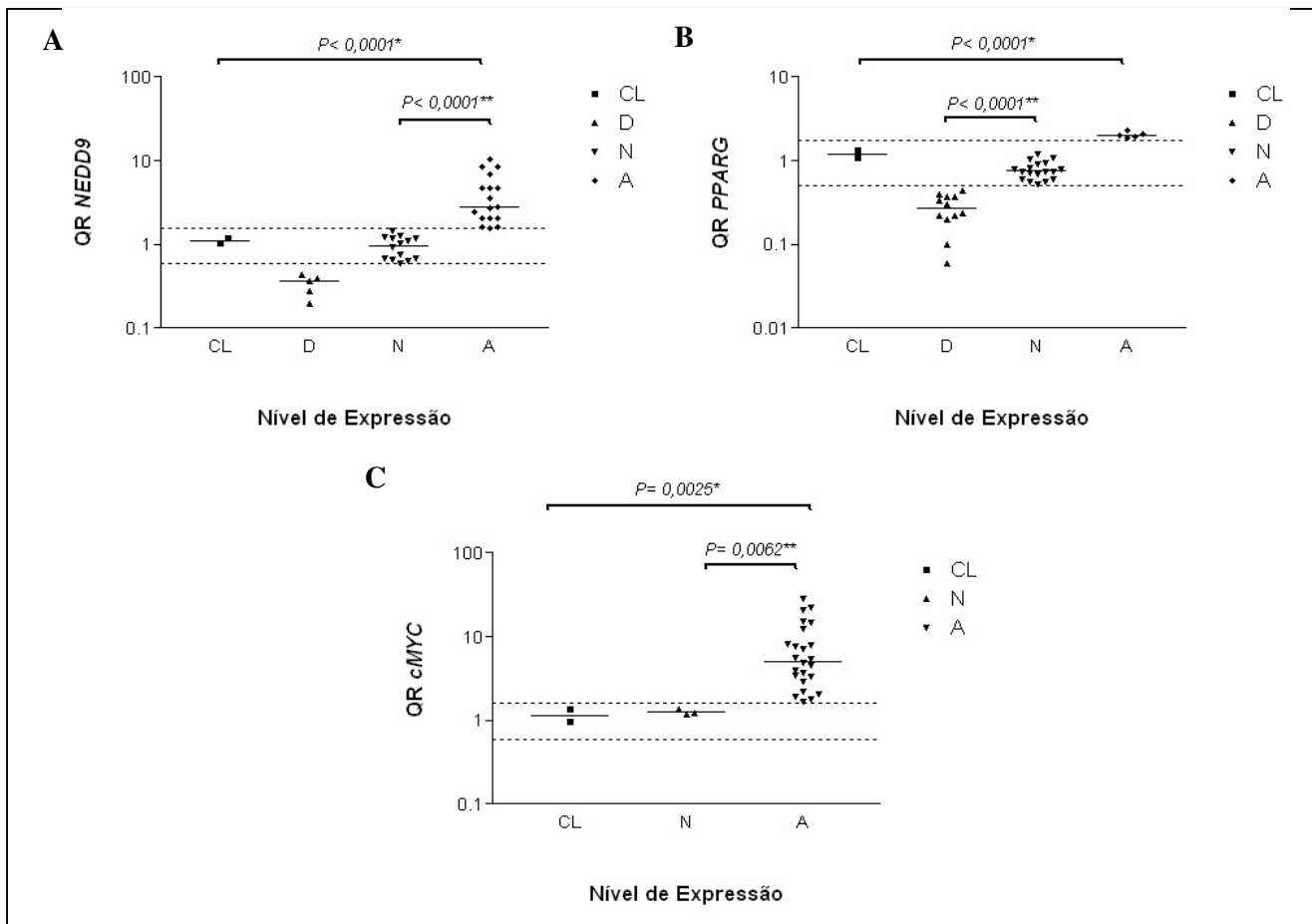


Figura 16. Os valores de expressão dos transcritos *NEDD9* (A), *PPARG* (B) e *c-MYC* (C) para os adenomas pleomórficos e normais (controles) estão apresentados em escala *log* e as barras indicam os valores da mediana. (QR) Quantificação Relativa; (CL) Controle; (N) Expressão Normal; (D) Diminuída; (A) Aumentada. Foram utilizados os testes estatísticos *Kruskal-Wallis* (*) e *Mann-Whitney* (**). Os valores de *P* encontram-se na figura.

Tabela 13. Análise comparativa entre as alterações genômicas detectadas em 6p24-p25, 3p25 e 8q24.21 e o padrão de expressão dos genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* em seis amostras de adenomas pleomórficos.

Análise casos HR-CGH	<i>NEDD9</i> (6p24-p25)	Expressão <i>NEDD9</i> (valor QR)	<i>PPARG</i> (3p25)	Expressão <i>PPARG</i> (valor QR)	<i>c-MYC</i> (8q24.21)	Expressão <i>c-MYC</i> (valor QR)
AP40	G	1,18	P	0,53	P	1,36
AP41	NA	1,28	NA	0,72	P	excluído
AP5F	NA	6,83	NA	0,79	NA	7,83
AP7F	NA	1,19	NA	0,39	NA	4,54
AP8F	NA	0,84	P	0,37	NA	1,63
AP9F	P	0,68	NA	0,24	P	1,78

(G) Ganho; (P) Perda; (NA) Nenhuma Alteração; (QR) Quantificação relativa.

Os dados clínico-patológicos como idade, gênero, cor, consumo de tabaco e álcool, tamanho do tumor (maior eixo em cm) e a presença de segundo tumor primário foram comparados estatisticamente com o nível de expressão dos genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* usando os testes *Qui-quadrado* e *Mann-Whitney* (*SPSS software versão 17*) (**Tabela 14**). Os valores de *P* estão representados na tabela. Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis testadas ($P \leq 0,05$).

Tabela 14. Comparação entre o padrão de expressão dos transcritos *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* e os dados clínico-patológicos dos adenomas pleomórficos analisados.

Variáveis	n	NEDD9 Expressão 0,60-1,56		P	n	PPARG Expressão 0,50-1,74		P	n	MYC Expressão 0,59-1,64		P
		N+D	A			N+A	D			N+D	A	
Idade (anos)				0,516				0,555				0,596
< 45	19	11 (57,9%)	8 (42,1%)		18	11 (61,1%)	7 (38,9%)		14	1 (7,1%)	13 (92,9%)	
≥ 45	17	8 (47,1%)	9 (52,9%)		17	12 (70,6%)	5 (29,4%)		13	2 (15,4%)	11 (84,6%)	
Gênero				0,238				0,130				0,274
Masculino	12	8 (66,7%)	4 (33,3%)		11	5 (45,5%)	6 (54,5%)		10	0 (0,0%)	10 (100,0%)	
Feminino	24	11 (45,8%)	13 (54,2%)		24	18 (75,0%)	6 (25,0%)		17	3 (17,6%)	14 (82,4%)	
Cor				0,558				0,690				-
Branco	33	18 (54,5%)	15 (45,5%)		32	21 (65,6%)	11 (34,4%)		25	1 (4,0%)	24 (96,0%)	
Não Branco	1	0 (0,0%)	1(100,0%)		1	1 (100,0%)	0 (0,0%)		1	1 (100,0%)	0 (0,0%)	
Outros	2	1 (50,0%)	1 (50,0%)		2	1 (50,0%)	1 (50,0%)		1	1 (100,0%)	0 (0,0%)	
Tabaco				0,460				1,000				0,201
Não	26	13 (50,0%)	13 (50,0%)		26	17 (65,4%)	9 (34,6%)		19	1 (5,3%)	18 (94,7%)	
Sim	9	6 (66,7%)	3 (33,3%)		8	5 (62,5%)	3 (37,5%)		8	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
Álcool				0,728				1,000				0,529
Não	23	12 (52,2%)	11 (47,8%)		22	14 (63,6%)	8 (36,4%)		18	3 (16,7%)	15 (83,3%)	
Sim	12	7 (58,3%)	5 (41,7%)		12	8 (66,7%)	4 (33,3%)		9	0 (0,0%)	9 (100,0%)	
Tamanho Tumor*				0,095				0,404				0,596
< Med	18	7 (38,9%)	11 (61,1%)		17	10 (58,8%)	7 (41,2%)		13	2 (15,4%)	11 (84,6%)	
≥ Med	18	12 (66,7%)	6 (33,3%)		18	13 (72,2%)	5 (27,8%)		14	1 (7,1%)	13 (92,9%)	
2° Tumor Primário				0,487				1,000				1,000
Não	34	17 (50,0%)	17 (50,0%)		33	22 (66,7%)	11 (33,3%)		25	3 (12,0%)	22 (88,0%)	
Sim	2	2 (100,0%)	0 (0,0%)		2	1 (50,0%)	1 (50,0%)		2	0 (0,0%)	2 (100,0%)	

* A mediana do tamanho do tumor para cada gene avaliado foi diferente porque o grupo de estudo nem sempre mostrava amplificação para as mesmas amostras: *NEDD9*: 2,55cm; *PPARG*: 2,60cm; *cMYC*: 3,0cm. (N) Expressão Normal; (D) Diminuída; (A) Aumentada; (n) número de casos avaliados.

4. Análise da expressão das proteínas CDH1 e HRK em Tumores de Warthin

O nível de expressão da proteína CDH1 foi avaliado por imuno-histoquímica em 88 cortes referentes a 47 casos de tumores de Warthin (FFEP). A expressão da proteína HRK foi avaliada em 86 cortes referentes a 45 casos de TW (FFEP). Destes, onze casos foram também avaliados por HR-CGH.

O escore de intensidade e extensão foi avaliado pela estimativa da porcentagem de coloração positiva presente em 10% das membranas celulares neoplásicas, para a proteína CDH1, e citoplasma, para a proteína HRK. Para a proteína CDH1 também foi avaliada a marcação positiva de membrana celular para ducto de glândula salivar normal e ácinos adjacentes ao tumor em cada caso, quando presentes no corte.

As amostras foram agrupadas em ausência de intensidade (escore 0), intensidade fraca (escore 1), moderada (escore 2) e forte (escore 3). Para a avaliação da marcação em extensão, o escore 1 foi representativo de marcação até 1/3 do corte, o escore 2, marcação de 1/3 a 2/3 e o escore 3, marcação acima de 2/3 da área do corte. Para a análise estatística, foram utilizados 46/47 casos para a proteína CDH1 e 44/45 casos para a proteína HRK, devido à ausência de informações presentes em um dos prontuários. Para a proteína CDH1, foi realizada a somatória dos escores de intensidade e extensão, obtendo-se um valor de escore entre 2 e 6. A partir desse valor, foi feito um novo agrupamento: marcação fraca para os escores 2-3 e marcação forte para os escores 4-6. Já para a proteína HRK, foi realizado um agrupamento entre os escores de intensidade: marcação negativa (0-1) e marcação positiva (2-3).

Na análise da proteína CDH1 nas células tumorais, 100% das amostras apresentaram marcação positiva de membrana e também tiveram mais de 1/3 da área marcada. Onze por cento dessas amostras foram identificadas com intensidade fraca, 11% com moderada e 79% com forte, sendo que 83% tiveram acima de 2/3 da área marcada. Para as glândulas salivares normais adjacentes ao tumor, foi observada marcação da membrana celular com intensidade fraca (35%), moderada (31%) e forte (35%). Destas, 81% apresentaram acima de 2/3 da área marcada. Para os ácinos adjacentes foi observada marcação com intensidade fraca (22%), moderada (26%) e forte (52%). Trinta e seis por cento destas amostras tiveram marcação na área total (**Figura 17**).

Na análise para a proteína HRK, 30% das amostras apresentaram ausência de marcação citoplasmática tanto em intensidade quanto extensão, 21% das amostras tiveram marcação de intensidade fraca, 26% moderada e 19% forte (**Figura 18**).

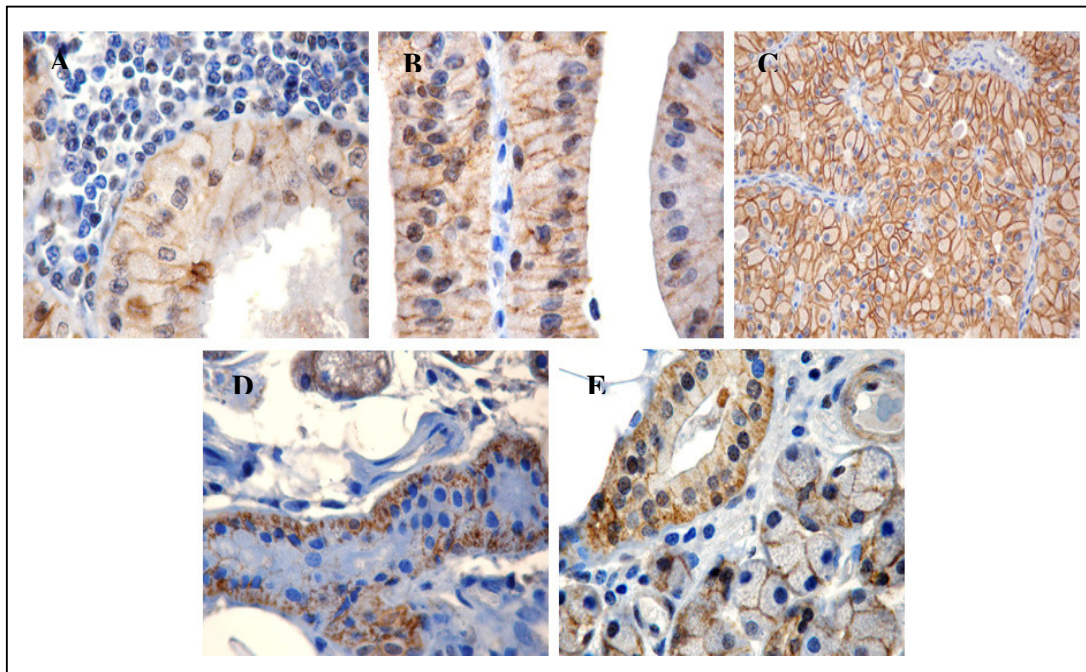


Figura 17. Análise imuno-histoquímica para a proteína CDH1 em tumores de Warthin. Escore histoquímico avaliando a intensidade da imuno-expressão para a membrana celular tumoral: escore 1 (A), escore 2 (B) e escore 3 (C); e para a membrana do ducto da glândula salivar normal adjacente ao tumor: escore 1 (D) e escore 2 (E), contendo os ácinos corados com escore 2.

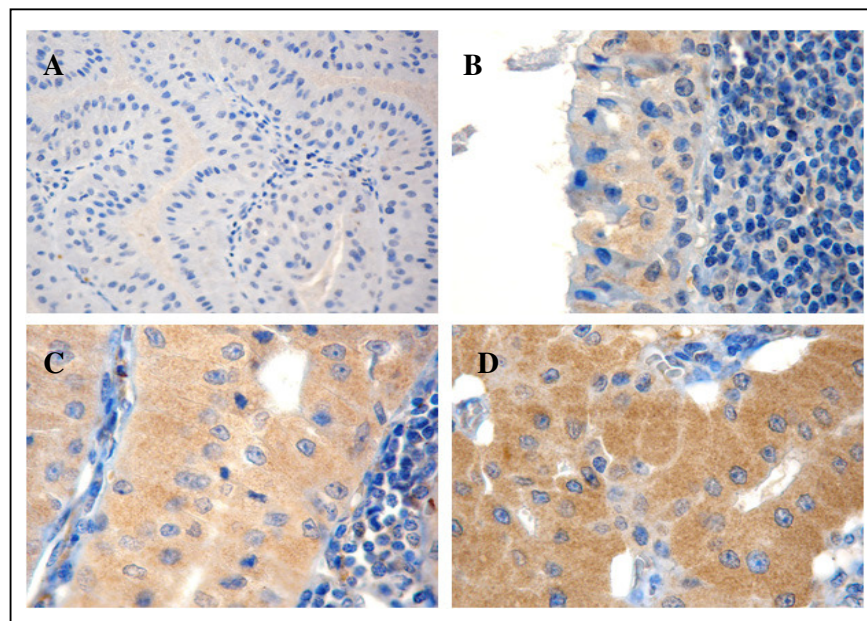


Figura 18. Análise imuno-histoquímica para a proteína HRK em tumores de Warthin. Os escores utilizados referem-se à intensidade da imuno-expressão citoplasmática para o tumor: negativo (A); escore 1 (B), escore 2 (C) e escore 3 (D).

Os testes *Exato de Fisher* e *Qui-Quadrado* foram utilizados para analisar as associações entre os dados obtidos na imuno-histoquímica e as variáveis clinico-patológicas, sendo que foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com $P < 0,05$. Nenhuma associação significativa foi observada entre a expressão da CDH1 e os dados clínicos, como gênero, sexo, cor, tabagismo, etilismo, tamanho do tumor, presença ou ausência de segundo tumor primário e recidiva (**Tabela 15**). Porém, 14/18 (78%) dos casos que apresentavam tumor menor que 2,5 cm tinham marcação forte de CDH1. O mesmo foi observado para ausência de recidiva e de desenvolvimento de segundo tumor primário [36/42 (86%) e 32/37 (87%), respectivamente]. Já para o HRK, foi encontrada uma associação significativa entre marcação negativa e tabagismo ($P = 0,029$) (**Tabela 15**). Além disso, 15/27 (56%) dos casos que apresentavam tumor maior ou igual a 2,5cm tinham marcação negativa para HRK. A mesma associação foi encontrada com presença de segundo tumor primário [5/9 (56%)].

Para a HR-CGH foram observadas perdas das regiões genômicas 16q22.1 e 12q24.22, onde estão mapeados os genes *CDH1* e *HRK*, respectivamente, em todos os 11 casos avaliados. Estes 11 casos também foram avaliados para a expressão das proteínas CDH1 e HRK (**Tabela 16**). Não foi observada concordância da deleção da região 16q22.1 com a ausência de expressão da proteína CDH1. Apenas os casos TW8, TW10 e TW12 apresentaram marcação fraca de CDH1 (escore da somatória de intensidade + extensão entre 2-3). Entretanto, para a deleção da região 12q24.22 foi observada concordância com a ausência da expressão de HRK em 8/11 casos de TW (72,73%). Adicionalmente, os casos TW5, TW14 e TW17 apresentaram marcação fraca de HRK (escore de intensidade entre 0-1).

Tabela 15. Comparação entre o padrão de expressão das proteínas CDH1 e HRK e os dados clínico-patológicos entre os tumores de Warthin analisados.

Variáveis	n	CDH1		P	n	HRK		P
		Marcação Fraca	Marcação Forte			Marcação Negativa	Marcação Positiva	
Idade (anos)				0,405				0,741
< 61	22	4 (18,2%)	18 (81,8%)		21	12 (57,1%)	9 (42,9%)	
≥ 61	24	2 (8,3%)	22 (91,7%)		23	12 (52,2%)	11 (47,8%)	
Gênero				1,000				0,546
Masculino	31	4 (12,9%)	27 (87,1%)		31	16 (51,6%)	15 (48,4%)	
Feminino	15	2 (13,3%)	13 (86,7%)		13	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
Cor				-				-
Branco	39	5 (12,8%)	34 (87,2%)		37	20 (54,1%)	17 (45,9%)	
Não Branco	0	0 (0,0%)	0 (0,0%)		0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Outros	7	1 (14,3%)	6 (85,7%)		7	4 (57,1%)	3 (42,9%)	
Tabaco				1,000				0,029
Não	7	1 (14,3%)	6 (85,7%)		7	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Sim	31	5 (16,1%)	26 (83,9%)		29	22 (75,9%)	7 (24,1%)	
Álcool				1,000				0,109
Não	20	3 (15,0%)	17 (85,0%)		19	10 (52,6%)	9 (47,4%)	
Sim	19	3 (15,8%)	16 (84,2%)		18	14 (77,8%)	4 (22,2%)	
Tamanho Tumor				0,191				0,865
< 2,5 cm	18	4 (22,2%)	14 (77,8%)		17	9 (52,9%)	8 (47,1%)	
≥ 2,5 cm	28	2 (7,1%)	26 (92,9%)		27	15 (55,6%)	12 (44,4%)	
2° Tumor Primário				1,000				1,000
Não	37	5 (13,5%)	32 (86,5%)		35	19 (54,3%)	16 (45,7%)	
Sim	9	1 (11,1%)	8 (88,9%)		9	5 (55,6%)	4 (44,4%)	
Recidiva				1,000				1,000
Não	42	6 (14,3%)	36 (85,7%)		40	22 (55,0%)	18 (45,0%)	
Sim	4	0 (0,0%)	4 (100,0%)		4	2 (50,0%)	2 (50,0%)	

Tabela 16. Comparação entre as alterações genômicas em 16q22.1 e 12q24.22 e o padrão de expressão das proteínas CDH1 e HRK em 11 amostras de tumores de Warthin.

Análise casos HR-CGH	<i>CDH1</i> (16q22.1)	Expressão CDH1 (Escore)	<i>HRK</i> (12q24.22)	Expressão HRK (Escore)
TW5	P	2+2 (4)	P	1+2
TW8	P	1+2 (3)	P	0+0
TW10	P	1+2 (3)	P	0+0
TW12	P	2+1 (3)	P	0+0
TW13	P	3+3 (6)	P	0+0
TW14	P	3+1 (4)	P	1+1
TW15	P	3+2 (5)	P	0+0
TW16	P	3+2 (5)	P	0+0
TW17	P	3+2 (5)	P	1+2
TW18	P	3+1 (4)	P	0+0
TW19	P	3+2 (5)	P	0+0

(P) Perda.



Discussão

O diagnóstico dos tumores das glândulas salivares maiores e menores é clínico. Sinais tais como a fixação do tumor, a indefinição em relação às estruturas adjacentes e a presença de paralisia facial são fatores indicativos de doença maligna. (Spiro, 1995). Entretanto, apesar dos avanços na descoberta de marcadores utilizados ao diagnóstico em patologia por imunohistoquímica e citogenética, a etiologia das neoplasias de glândulas salivares permanece ainda incerta. Dados em literatura indicam que os tumores originários de glândulas salivares são extremamente complexos sob o aspecto histológico, que é reflexo da diferenciação de mais de um tipo de célula tumoral, de seus arranjos em padrões celulares e da síntese de matriz extracelular depositada por algumas células tumorais (Dardick et al., 1992).

Os estudos citogenéticos e moleculares são limitados pela pequena quantidade de amostra, e não consideram a heterogeneidade morfológica e biológica inerente em tumores de glândulas salivares (Press et al., 1994; Jones et al., 1996; Gillenwatter et al., 1997; Holst et al., 1999; Roijer et al., 2002; Nasser et al., 2003). Apesar do esforço para identificar novos marcadores úteis ao diagnóstico e terapia, pouco progresso tem sido obtido nas últimas três décadas (Ximenes-Filho et al., 2002).

Recentemente, alguns estudos têm utilizado a técnica de hibridação genômica comparativa para a identificação de regiões genômicas críticas envolvidas no processo tumoral. A CGH é uma técnica citogenética molecular que permite a rápida detecção de alterações no número de cópias cromossômicas do genoma inteiro numa única reação de hibridação, sem o conhecimento prévio da região alterada (Kallioniemi et al., 1992). A introdução da CGH de alta resolução (HR-CGH) tem como diferença da CGH tradicional a utilização de intervalos de referência padronizados com amostras normais em detrimento de intervalos fixados (Kirchhoff et al., 1997; 1998).

Neste estudo, foi utilizada a técnica de HR-CGH para a triagem de ganhos e perdas de DNA em 66 amostras de neoplasias de glândulas salivares. Foram analisados diferentes tipos histológicos para identificar alterações genômicas específicas a cada um destes subtipos histológicos.

Estudos de CGH em **adenomas pleomórficos** mostram resultados discrepantes. Toida et al. (2001) analisaram dois casos de AP por CGH e detectaram perdas em 5q12.4-q14.1, 9q12-q21.13 e 16q11.2; e ganhos em 20p12.1. Em contrapartida, Kasamatsu et al. (2005) analisaram, pela mesma técnica, dez casos de AP e detectaram ganhos em 1p36.3, 8q24.3,

11p15, 11q12-q13, 12q13, 14q32, 16q12.1-q12.2, 17q25, 19p13.3, 19q13.2, 20q13.3, 22q13, Xq28; e ausência de perdas. No presente estudo, foi detectada perda de **5q13** em 15/27 AP e perda da região **16q11.2** em 3/27 AP, em concordância com o relato de Toida et al. Foram observados também ganhos em **11p15** (9/27), **11q12-q13** (11/27), **17q25** (7/27), **20q13.3** (7/27), **22q13** (8/27) e ganho do cromossomo **X** (9/27) em concordância com os achados de Kasamatsu et al. (2005). Desta forma, os dados do presente estudo confirmam o envolvimento dessas regiões genômicas em adenomas pleomórficos.

O gene *PLAG1*, mapeado em 8q12, foi relatado como envolvido no desenvolvimento dos **adenomas pleomórficos**. A ativação da expressão deste gene é resultado de translocações cromossômicas recorrentes que podem envolver um grande número de diferentes arranjos (Kandasamy et al., 2007; Asp et al., 2006; Persson et al., 2008). Nas duas translocações mais frequentes, t(3;8)(p21;q12) e t(5;8)(p13;q12), a troca do promotor *PLAG1*, que é inativo nas glândulas salivares maduras, por um forte promotor derivado da β -catenina (*CTNNB1*) e por um receptor de fator inibitório de leucemia (*LIFR*), respectivamente, leva à expressão anormal do *PLAG1* nas células tumorais (Kas et al., 1997; Voz et al., 1998). Em outro estudo, Stenman et al. (2005) detectaram a fusão entre os genes *HMGA2* (12q15) e *PLAG1*, que foram observados co-expressados em alguns subtipos de AP. Asp et al. (2006) demonstraram novas fusões gênicas entre *CHCHD7-PLAG1* e *TCEA1-PLAG1* recorrente em adenomas pleomórficos; e estas fusões são originadas de rearranjos intra-cromossômicos dentro das bandas 8q11.2-q12. Entre os cinco tumores detectados com estas fusões, dois tiveram translocações citogenéticas visíveis como t(8;15)(q12;q14) e t(6;8)(p21.3-22;q13) e três apresentaram cariótipos normais. Em 2008, Persson et al. avaliaram um subgrupo de AP com cromossomos em anel de derivação incerta e relataram a fusão gênica entre *FGFR1-PLAG1* e sua contribuição no desenvolvimento dos AP. Uma limitação da técnica de CGH é não permitir a identificação de rearranjos balanceados como translocações. Entretanto, neste estudo foi observado ganho da região **8q12** em 8/27 AP.

A t(11;19)(q21;p13) encontrada em **carcinomas mucoepidermóides e tumores de Warthin** foi clonada por Tonon et al. em 2004. Dois genes estão envolvidos neste evento: *MECT1* e *MAML2* mapeados em 19p13 e 11q21, respectivamente. Esta translocação origina o gene quimérico *MECT1-MAML2* que altera o mecanismo normal da via de sinalização Notch contribuindo para a tumorigênese (Enlund et al., 2004; Martins et al., 2004; Wu et al., 2005). Novamente, esta alteração não pode ser detectada pelo método empregado no presente estudo. Porém, vários mecanismos que resultam em translocação levam também a perda de seqüências genômicas que poderiam ser detectadas dependendo do tamanho do segmento

deletado. Neste estudo foi observada a perda da região **19p13.3**, onde se mapeia o gene *MECT1*, em 10/11 casos de TW analisados por HR-CGH. A perda da região **11q21**, onde se mapeia o gene *MAML2*, foi observada em 4/11 casos. Nestes casos seria interessante a confirmação das deleções por FISH ou a identificação da translocação usando técnicas baseadas na PCR ou FISH, já que não há preparações cromossômicas disponíveis para análise por bandamento GTG.

Recentemente, Verdorfer et al. (2009) avaliaram 19 amostras FFEP de **carcinomas mucoepidermóides** por CGH e demonstraram ganhos do cromossomo X e perdas de cromossomos inteiros ou regiões nos cromossomos 1, 2 e 15, como as alterações mais freqüentes. No presente estudo, foram detectadas perdas em **1q32-q41** (2/4), **2p16-p21** (2/4), **2p22-p23** (3/4), **2q32** (3/4), **2q34-q37** (3/4), **15q12-q13** (2/4), **15q14** (3/4), **15q15-q22** (2/4) e **15q24-q26** (2/4), em concordância os achados dos autores.

Giefing et al. (2008) utilizando a CGH em amostras de **adenomas pleomórficos e tumores de Warthin** encontraram a deleção da região 12q24.2 em 12/29 casos e da região 17p13.1 em 11/29 desses tumores; a amplificação da região 13q22.1-q22.2 foi observada em 13/29 casos. Neste estudo, foi encontrada deleção da região **12q24.2** em 17/27 AP e em todos os 11 TW analisados; a deleção da região **17p13.1** foi observada em 8/11 TW. Entretanto, não foi observado ganho em comum da região 13q. Na região 12q24.2 está mapeado o gene *HRK* (*Harakiri*) (mapeado em 12q24.22), que tem papel importante de ativação da apoptose pela interação com proteínas repressoras da morte BCL2 e BCLXL. A redução da expressão deste gene foi relacionada à progressão tumoral por modular a morte celular (Inohara et al., 1997; Sunayama et al., 2004). Estudos iniciais revelaram que o gene *Harakiri* é alvo de inativação epigenética em cânceres gástricos e colorretais (Obata et al., 2003). Recentemente, foi demonstrada que a inativação deste gene ocorre principalmente por hipermetilação do seu promotor em cânceres prostáticos (Higuchi et al., 2008). A proteína HRK se localiza na membrana de organelas intracelulares num padrão semelhante ao relatado para BCL2 e BCLXL. A deleção em 17p13.1 coincide com a região onde está mapeado o gene *TP53*, um supressor tumoral que tem sido observado deletado em diversos cânceres. Yamamoto et al. (1998a) mostraram LOH para *TP53* em adenomas pleomórficos e carcinomas ex-adenomas pleomórficos, sugerindo o papel deste gene na formação e progressão de tumores de glândulas salivares.

Morio et al. (2002) investigaram ganhos e perdas genômicas pela CGH em **carcinomas ex-adenomas pleomórficos** e detectaram alterações genômicas em cinco de sete casos. Ganhos recorrentes foram observados em 4p, 6q, 12p, 13q, 15q11.2-q21 e 21p; e as

perdas em 19p. Neste estudo foi observado ganho em **13q14** em 3/6 CXAP analisados. Nesta região encontra-se mapeado o gene *NEK3* (13q14.13) que atua no ciclo celular, divisão celular e mitose.

Os ganhos e perdas genômicas detectados nos **carcinomas adenóides císticos** foram concordantes com os relatos de CGH em literatura envolvendo perdas das regiões 6q e 12q; entretanto ganhos comuns dos cromossomos 16, 18, 19 e 22 não foram observados neste estudo (El-Rifai et al., 2001; Toida et al., 2001; Freier et al., 2005; Kasamatsu et al., 2005; Rao et al., 2008). A perda de **6q25** foi detectada em 6/6 casos e perda de **6q26-q27** em 5/6 casos de CAC. O gene *TSP2* (6q27), um potencial inibidor do crescimento tumoral e da angiogênese, foi sugerido como candidato a supressor tumoral em CAC (Kishi et al., 2003). Recentemente, Rao et al. (2008) não detectaram alterações envolvendo o gene *TSP2* nestes tumores. Foram observadas perdas freqüentes em **12q22-q23** (6/6) e **12q24.1** (4/6) entre os CAC avaliados neste estudo. Rutherford et al. (2005) observaram a redução da expressão dos genes *TCF-1*, *ZNF10/KOX1*, *OAS1* e *P2RX4*, mapeados em 12q24, sugerindo que há uma forte regulação negativa destes genes em CAC.

Em **carcinomas epiteliais-mioepiteliais** os relatos de CGH mostraram alterações envolvendo o cromossomo 8 (Hungermann et al., 2002). Vékony et al. (2009) relataram que mioepiteliomas e carcinomas epiteliais-mioepiteliais apresentaram um número limitado de alterações cromossômicas por CGH *array*. A análise supervisionada e não supervisionada entre os tumores benignos e malignos revelou uma região de 36 Mbp em 8q12.1-q22.1 sendo freqüentemente encontrada com aumento no número de cópias de DNA principalmente em tumores malignos. Esta região cromossômica (8q12.1-q22.1) contem 99 genes conhecidos e foi detectada com ganho em 50% (6/12) dos carcinomas mioepiteliais, enquanto nos tumores benignos, este ganho foi ausente (0/15). Nesta região encontram-se genes candidatos interessantes como: *RAB2A*, um membro da família de oncogenes RAS; *MMP16*, uma metaloproteinase de matriz, a proteína tumoral *TPD52*, o gene transformante de tumor da pituitária (*PTTG3*) e a proteína 1 da translocação 1 de leucemias mielogênicas (*RUNX1T1*) (Vékony et al., 2009).

O estudo de CGH em três casos de **adenocarcinomas** (ACAR) por Kasamatsu et al. (2005) demonstrou ganhos em 1p, 1q, 2q, 3p, 3q, 4p, 5p, 5q, 6p, 6q, 7p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 10q, 11p, 12p, 13p, 13q, 14q, 15q, 16p, 16q, 18p, 18q, 19p, 20p, 21q, Xp, Xq; e perdas em 1p, 5q, 8p, 14q, 16p, 16q e 22q. Em outro estudo, Santos (2007) analisou cinco casos de **adenocarcinomas de células basais** (ACCB) de quatro pacientes, por HR-CGH e observou perdas em 4p14-p15.1, 10q25-q26, 14q24-q31 e 19q13.2-q13 e ganhos em 22q13.

Perdas em 14q e ganhos em 22q foram concordantes aos achados dos dois autores. Nos casos de ACAR avaliados no presente estudo, foram observados ganhos em **1p** (2/3) e perdas em **16q** (3/3) concordantes com o estudo de Kasamatsu et al. (2005); e ganhos em **22q** (2/3) foram concordantes com os achados dos dois autores.

Em **carcinomas ductais salivares** os relatos de CGH revelaram um aumento no número de alterações em casos de pacientes com idade da doença avançada, entretanto nenhuma alteração recorrente foi observada (Hungermann et al., 2006). No presente estudo, foram detectadas alterações recorrentes nos três casos de CDS analisados pela HR-CGH com perdas genômicas mais prevalentes.

Neste estudo foram observadas freqüentes perdas genômicas para os **oncocitomas**, entretanto ganhos foram ausentes. Perdas de regiões nos cromossomos 1, 2 e 15 foram concordantes com os achados de CGH para os **carcinomas mucoepidermóides** deste estudo e do estudo de Verdorfer et al. (2009). Perdas em **14q** também foram freqüentes para os ON assim como para os **adenocarcinomas** deste estudo, em concordância com estudos prévios de CGH (Kasamatsu et al., 2005; Santos, 2007). Não temos conhecimento de dados de perdas ou ganhos genômicos pela CGH em amostras de oncocitomas. Os resultados obtidos pela CGH nas demais neoplasias de glândula salivares são controversos.

Foram observadas regiões mínimas comuns alteradas nos diferentes tipos de tumores de glândula salivar. Perdas envolvendo a região **1q32-q41** foram observadas freqüentemente em 16/27 AP; 7/11 TW; 3/6 CXAP; 6/6 CAC; 2/4 CME; 2/3 ACAR e 3/3 CDS. O gene *KISS1* mapeado em 1q32 atua como supressor metastático. Este gene foi detectado mutado em melanomas malignos e em alguns tipos de cânceres de mama, sugerindo seu envolvimento na regulação do processo metastático em cânceres humanos (Lee e Welch, 1997; Ohtaki et al., 2001). Outro gene associado a esta região é o *CENPF* (1q31-q41), uma proteína centromérica que atua na organização do complexo cinetocórico durante a segregação mitótica (Liao et al., 1995).

Ganhos em **4q23-q24** foram observados em 3/11 TW; 3/6 CXAP; 3/6 CAC e 2/2 CEM; nesta região estão mapeados os genes *SMARCAD1* (4q22-q23) que está envolvido em processos de modificação da cromatina e regulação da transcrição (Okazaki et al., 2008); e *MAPK10* (4q22.1-q23) que atua como transdutor de sinal e tem papel numa variedade de processos celulares como proliferação, diferenciação e regulação da transcrição (Song et al., 2009).

Perdas em **6q22** foram encontradas em 9/11 TW; 4/6 CXAP; 5/6 CAC; 2/4 CME; 2/3 ACAR e 2/2 CEM; onde se encontra mapeado o gene *LAMA2* (6q22-q23) que está envolvido na regulação da adesão celular a matriz extracelular e migração celular (Schéele et al., 2007).

Perdas da região **7p14** foram observadas em 14/27 AP; 9/11 TW; 4/6 CXAP; 3/6 CAC e 2/2 CEM. Nesta região encontram-se genes como o *SEPT7* (7p14.1-p14.3), que participa da localização de cinetócoros e sua deleção resulta na perda de segregação dos cromossomos decorrente a perda de expressão da proteína CENP-E (Zhu et al., 2008); e o gene *INHBA* (7p13-p15), um suposto candidato a supressor tumoral devido a seu papel de inibidor do crescimento celular em cânceres de mama (Reis et al., 2004).

Ganhos em **7q11.2** foram observados em AP (11/27); TW (4/11); CAC (4/6) e CDS (3/3). Nesta região estão mapeados os genes: *TBL2* (7q11.23) que participa de processos biológicos e vias de sinalização intracelular; e *FGL2*(7q11.23) que atua na transdução de sinal; indução da angiogênese e metástase tumoral via indução de citocinas (Su et al., 2008).

Ganhos em **8p23** foram observados comumente em AP (9/27) e CXAP (3/6). Amplificações em 8p23 foram detectadas em alguns subtipos de carcinomas mamários por CGH *array* (Loo et al., 2004) e translocações em 8p23 também foram relatadas em neoplasias hematológicas e carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (Wong et al., 2000; Jin et al., 2001). Nesta região está mapeado o gene *MFHAS1* (8p23.1), um suposto oncogene relacionado a alguns histiocitomas fibrosos malignos (Tagawa et al., 2004). Sakabe et al. (1999) relataram que a proteína MFHAS1 tem vários domínios específicos como RAS, domínios de ligação a leucinas, sítios de ligação ATP/GTP, repetições em tandem ricas em leucinas, entre outros; que são elementos estruturais ou funcionais importantes na interação de proteínas relacionadas ao ciclo celular. A função normal da MFHAS1 inclui possível atividade tumorigênica. Os autores demonstraram pela primeira vez esta atividade transformante em um ensaio tumorigênico *in vivo* e sugeriram que o *MFHAS1* não é somente um gene alvo de amplificação, como também de translocação. Um dado interessante é que dos nove AP analisados por HR-CGH que apresentaram ganho da região 8p23, três casos (AP49, AP50 e AP55) apresentaram recidiva e/ou um segundo tumor primário, sugerindo uma associação entre as alterações nesta região e agressividade tumoral.

Perdas em **9p21** também foram recorrentes em 16/27 AP; 11/11 TW; 6/6 CXAP; 3/6 CAC; 2/3 ACAR e 2/2 CEM. Nesta região está mapeado o gene *CDKN2A*, um gene supressor tumoral que codifica a proteína p16, importante inibidora do ciclo celular. Esta região foi relatada deletada numa variedade de tumores, incluindo glioblastomas, leucemias, melanomas malignos da mucosa, cânceres de bexiga, carcinomas de células escamosas da cabeça e

pescoço e carcinomas adenóides císticos (Gebhart et al., 2003; Willman e Hromas, 2006; Suzuki et al., 2007). O gene *TUSC1*, mapeado em 9p21.2, foi sugerido como um candidato a supressor tumoral em cânceres de pulmão (Shan et al., 2004).

Perdas em **9q21** foram encontradas nos casos de TW (8/11) e CXAP (6/6). Nesta região está mapeado o gene *RASEF* (9q21.32), que está associado com o transporte protéico e sinal de transdução; e foi correlacionado à suscetibilidade ao melanoma humano (Jonsson et al., 2005). Perda alélica em 9q foi associada a fenótipos agressivos de carcinomas papilares da tireóide (Kitamura et al., 2000). Deleções da região 9q21.1-q21.2 foram correlacionadas a progressão de tumores de células escamosas da cabeça e pescoço (Abou-Elhamd et al., 2008).

Em **11p11.2** foram detectados ganhos genômicos em 11/27 AP e 3/11 TW. Nesta região está mapeado o gene *MADD* que tem papel importante no controle da sobrevivência/morte de células tumorais e confere resistência significativa a indução da apoptose por TRAIL (Mulherkar et al., 2007).

Foram observadas freqüentes deleções de **12q22-q24** em 20/27 AP; 11/11 TW; 3/6 CXAP; 6/6 CAC; 2/4 CME; 3/3 CDS e 2/2 CEM, onde está mapeado o gene *DUSP6* (12q22-q23). Este gene foi identificado como supressor tumoral em linhagens celulares humanas de carcinomas pancreáticos e atua principalmente na inativação da atividade de *MAPK* e na regulação da progressão do ciclo celular (Xu et al., 2005). O gene *SUDS3*, mapeado em 12q24.23, atua na modificação da cromatina e tem sido investigado seu papel de supressor metastático em cânceres de mama (Silveira et al., 2009). O gene *KSR2* (12q24.22-q24.23), que atua em cascatas de sinalizações intracelulares, foi relatado envolvido na regulação negativa da via de sinalização NF-KappaB e da via MAP quinase mediada por Cot, que estão associadas a processos inflamatórios e oncogênese (Channavajhala et al., 2003). Nesta região encontra-se também o gene *NOS1* (12q24.2-q24.31),

Outra região deletada foi **16p12-p13.3** em 12/27 AP; 10/11 TW; 3/6 CXAP; 3/6 CAC; 3/3 CDS e 2/2 ON. Rødahl et al. (2005) detectaram perda desta região por CGH cromossômico em 2/4 schwannomas e validaram subsequentemente por LOH (perda de heterozigose) e FISH. O gene *AXINI* (16p13.3) está mapeado nesta região e é responsável pela codificação de uma proteína citoplasmática que funciona como um regulador negativo da via de sinalização de *WNT1* e que pode induzir a apoptose. Em carcinomas de esôfago foi observada uma diminuição da sua expressão (Nakajima et al., 2003).

Perdas em 16q são freqüentemente relatadas em tumores sólidos (tais como câncer de próstata, mama, pulmão, nasofaringe e hepatocelular) por CGH cromossômico, sugerindo a presença de genes supressores tumorais nesta região (Schick et al., 2007). Seis genes: *WWOX*

(16q23.3-q24.1), *WFDC1* (16q24.3), *MAF* (16q22-q23), *FOXF1* (16q24), *MVD* (16q24.3) e *CRISPLD2* (16q24.1) localizados em 16q foram relatados como possíveis supressores tumorais em cânceres de próstata (Watson et al., 2004). No presente estudo, foram observadas perdas em **16q22-q24** em 18/27 AP; 11/11 TW; 3/6 CXAP; 5/6 CAC; 3/4 CME; 2/3 ACAR; 3/3 CDS; 2/2 CEM e 2/2 ON. Outros genes mapeados nesta região incluem o *CDHI* ou *E-caderina* (16q22.1), uma molécula de adesão que atua como supressor tumoral em diversas neoplasias, como carcinomas gástricos e ginecológicos e o *CTCF* (16q22.1), um fator de transcrição regulado por imprinting e sensível a metilação, que foi associado com a tumorigênese mamária (Risinger et al., 1994; van Wezel et al., 2005).

Perdas em **17q21-q22** foram observadas em 12/27 AP; 11/11 TW; 4/6 CXAP; 3/3 CDS e 2/2 CEM. O gene supressor de metástase *NME1* ou *NM23* (17q21.3) tem sido relatado como deletado em carcinomas de pulmão, mama, colorretal e renal (Eddy et al., 1991; Tee et al., 2006; Boisson et al., 2007). Redução da expressão de *NM23* foi significativamente associada com o comportamento agressivo de melanomas e carcinomas de mama, cólon e gástricos. Em contrapartida, altos níveis de expressão do gene *NM23* foram observados em estágios avançados de carcinomas da tireóide e associados com reduções significantes da sobrevivência de pacientes com neuroblastomas e osteosarcomas. Portanto, a expressão de *NM23* é divergente em vários tumores malignos, e sua redução de expressão parece estar relacionada com o aumento do potencial metastático na maioria dos tipos de carcinomas. Contudo, tem sido hipotetizado que o gene *NM23* tem um papel tecido-específico e que diferentes mecanismos regulatórios atuam em diferentes tumores (Tee et al., 2006).

Quarenta por cento dos cânceres de células escamosas da cabeça e pescoço mostram LOH em 18q e este achado tem sido associado a pacientes com pior prognóstico (Takebayashi et al., 2004). Nesta região está mapeado o gene supressor tumoral *CDH19* (18q22-q23), uma caderina de adesão que deletada contribui para a invasão tumoral e progressão dos CCECP (Blons et al., 2002). Neste estudo, observaram-se perdas em **18q** em 5/27 AP; 9/11 TW; 3/6 CXAP; 5/6 CAC; 3/4 CME; 2/3 ACAR; 3/3 CDS; 2/2 ON e 2/2 CEM. Nesta região encontra-se mapeado também o gene supressor tumoral *SMAD4* (18q21.1), que foi relatado como deletado ou com expressão diminuída numa variedade de tumores malignos, incluindo carcinomas de pâncreas, pulmão, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, colorretal e mama (Hahn et al., 1998; Takei et al., 1998; Takakura et al., 1999; Natsugoe et al., 2002; Xie et al., 2003; Reinacher-Schick et al., 2004; Deckers et al., 2006). A ausência ou diminuição da atividade do *SMAD4* diminui a responsividade do *TGFBI* (ou *TGF-β*), um fator de inibição do ciclo celular que leva à proliferação destas neoplasias (Grady, 2005; Willman e Hromas, 2006).

Regiões de alta instabilidade genética foram identificadas em 19p13.1 em carcinomas hepatocelulares, sugerindo a presença de genes envolvidos na supressão do processo metastático (Zhang et al., 2003). Perdas envolvendo **19p13.1-p13.2** foram detectadas neste estudo em 10/21 AP; 10/11 TW; 3/3 CDS; 2/2 ON e 1/1 CAC. Nesta região estão mapeados os genes *PRKACA* (19p13.1), uma molécula cAMP importante numa variedade de funções celulares e *CASP14* (19p13.1) que tem papel central na apoptose (Tasken et al., 1996; Park et al., 2006).

Perdas em **19q13.1-q13.4** também foram recorrentes (16/27 AP; 11/11 TW; 3/6 CXAP; 3/6 CAC; 3/3 CDS e 2/2 CEM). O gene *TGFBI* (*TGF-β*) está mapeado em 19q13.2 e codifica um peptídeo com funções relacionadas ao controle da diferenciação e proliferação celular, funcionando como um potente inibidor da proliferação de células epiteliais (Seoane, 2006). Adicionalmente, observou-se a deleção de outras regiões genômicas onde se mapeiam genes envolvidos na via de sinalização do *TGFBI* entre os 11 TW em estudo, incluindo: *CDHI* (**16q22.1**) em 11 casos; *CBP* (**16p13.3**) em 10 casos; *SARA* (**1p32.2**) em 10 casos e *ERK1*(**16p11.2**) em 11 casos. O tumor de Warthin é composto por uma bicamada colunar e um epitélio basalóide que forma múltiplos cistos com numerosas papilas acompanhadas por proliferação do folículo contendo tecido linfóide (Ellis, 2007). Os tumores aqui estudados passaram por processo de microdissecção, e portanto, foram estudadas as células epiteliais dos TW. Assim, podemos sugerir que as células do tecido epitelial apresentariam perdas do gene *TGFBI* resultando em perda do controle da proliferação celular nestes tumores. Esses achados sugerem que genes envolvidos na via do TGF-β poderiam estar associados aos tumores de Warthin e seriam candidatos interessantes para validação.

A deleção da região 22q, onde está mapeado o gene *NF2* (22q12.2) que atua na conexão do citoesqueleto com a membrana celular, tem sido relatada em schwannomas, glioblastomas e astrocitomas anaplásicos (Willman e Hromas, 2006). Neste estudo, foi observada perda da região **22q12-q13** (17/27 AP; 10/11 TW; 4/6 CXAP; 5/6 CAC; 3/4 CME; 2/3 ACAR; 3/3 CDS e 2/2 ON). Nesta região também se mapeia o gene *TIMP3* (22q12.3), pertencente à família TIMP (proteínas inibidoras de metaloproteinases de matriz). Este gene tem sido associado com diversas funções biológicas, incluindo inibição do crescimento tumoral e metástase. Han et al. (2004) demonstraram um efeito inibitório da invasão celular (tumor de mama) em células transfectadas-*TIMP3* quando comparadas às células controle-*TIMP3* negativo, sugerindo que a inibição da invasão celular do câncer de mama, tanto pelo suplemento exógeno quanto pela expressão endógena de *TIMP3*, pode ser fisiologicamente ou patologicamente relevante no microambiente tumoral. Em 22q13.31 esta mapeado o gene

PHF21B gene (PHD finger protein 21B), um fator transcricional com um domínio *PHD zinc finger*. As proteínas *Zinc fingers* variam amplamente na estrutura, bem como na sua função, por interações de ligação DNA/RNA para proteína-proteína e associação de membrana. O termo *zinc finger* é amplamente utilizado para identificar qualquer estrutura compacta que é estabilizada por íons de zinco, o qual desempenha um papel estrutural. Estas proteínas podem estar envolvidas nos processos de duplicação e reparo, transcrição, metabolismo e sinalização, proliferação celular e apoptose (Bienz, 2006).

Excluindo-se as alterações genômicas comuns aos diversos tipos tumorais, foram observadas alterações genômicas exclusivas para os diferentes tipos histológicos.

Para os **adenomas pleomórficos**, foram observadas alterações genômicas exclusivas envolvendo ganhos e perdas genômicas, sendo que os ganhos genômicos foram mais freqüentemente observados. Ganhos em **2p25** foram observados em 7/27 casos avaliados. Nesta região está mapeado o gene *GREB1* (2p25.1), um regulador de estrogênio, com importante papel na proliferação de cânceres de mama e próstata (Rae et al., 2006). O gene *ADAM17* (2p25), também mapeado nesta região, codifica uma metaloproteinase de matriz que está envolvida na formação e proliferação de cânceres (McGowan et al., 2008). Ganhos em **2q37** (8/27), onde está mapeado o gene *HJURP* (2q37.1), um fator central na deposição de CENP-A e manutenção dos centrômeros (Dunleavy et al., 2009). Foram observados ganhos em **3q12** (10/27), onde está mapeado o gene *TFG* (3q12.2) que atua na via *NF-KappaB*. Este gene está envolvido em rearranjos com os genes *TRKT3*, *ALK* e *NOR1* (Miranda et al., 2006). Em **3q29** foram observados ganhos em 7/27 AP. O gene *TNK2* (3q29), encontra-se mapeado nesta região, e codifica uma tirosina quinase cuja amplificação em tumores primários foi correlacionada com pior prognóstico. Howlin et al. (2008) relataram que este gene induz a migração e invasão de células tumorais de mama via preservação da expressão de *EGFR*, explicando assim seu comportamento oncogênico *in vitro* e sua correlação com cânceres de mama metastáticos *in vivo*. Foram observadas perdas em **5p12** (14/27), região onde está mapeado o gene *FBXO4* (5p12), que codifica uma proteína de ubiquitinação. Foi observado que mutações neste gene que levam à inibição da atividade de Fbxo4 resultando no acúmulo nuclear de ciclina D1 e na transformação oncogênica em diversos cânceres humanos (Barbash et al., 2008). Ganhos em **5p15.2-p15.3** (10/27), onde está mapeado o gene *TRIO* (5p15.2) foram observados entre os AP. Amplificação deste gene e expressão elevada do mRNA foram associadas à invasão de tumores em crescimento e a rápida proliferação celular tumoral em cânceres de bexiga (Zheng et al., 2004); e com a progressão de sarcomas de tecidos moles (Adamowicz et al., 2006). O gene *TERT*, também mapeado em 5p15.33, tem função na

manutenção dos telômeros e foi sugerido como marcador tumoral de progressão em diversas neoplasias em estágios iniciais (Collins, 2008). Ganhos em **5q23** foram detectados em 9/27 AP. Nesta região encontra-se o gene *HBEGF* (5q23), um fator de crescimento membro da família *EGF*, responsável pelo estímulo da diferenciação e crescimento celular. Este gene tem sido relatado envolvido na angiogênese e gênese tumoral (Scuderi e Failla, 2008). Ganhos em **6p24-p25** foram observados em 8/27 casos. Nesta região está mapeado o gene *EDN1* (6p24.1), que estimula a migração de células endoteliais e sinalização célula-célula. A proteína EDN1 foi relatada com níveis de expressão elevados no soro mulheres com câncer de mama (Yildirim et al., 2008) e em linhagens celulares de cânceres de bexiga (Wülfing et al., 2005), sugerindo o valor prognóstico deste gene. Está mapeado também o gene *CAGE1* (6p24.3), com função ainda desconhecida; foi observada expressão elevada deste gene em cânceres prostáticos, de mama e da tireóide (Parmigiani et al., 2006). O gene *NEDD9* (mapeado em 6p24-p25), atua na ativação da progressão e invasão tumoral. Expressão elevada deste gene foi correlacionada com o desenvolvimento de metástases em tumores sólidos (O'Neill et al., 2007). O gene *TWIST1* (7p21.2) está associado a indução da progressão tumoral, promovendo o crescimento celular e dirigindo a oncogênese em vários cânceres, via expressão de *YB-1* (Shiota et al., 2008). No presente estudo foram observados ganhos em **7p21** (7/27). Ganhos em **9p23-p24** foram observados em 8/27 AP avaliados. Nesta região estão mapeados genes envolvidos com processos tumorais como *JMJD2C* (9p24.1), que tem papel na modificação da cromatina e transcrição. Aberrações cromossômicas e expressão elevada do transcrito deste gene foram associadas com carcinomas de células escamosas do esôfago (Cloos et al., 2006). O gene *RLN1* (9p24.1), foi associado a promoção da proliferação celular, invasividade e adesão *in vitro* em linhagens de cânceres prostáticos (Feng et al., 2007). Foram detectados freqüentes ganhos em **9q21** (8/27). Nesta região está mapeado o *HNRNPK* (9q21.32-q21.33), um gene que pertence à subfamília de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas e que atua na progressão do ciclo celular. A expressão elevada deste gene foi relacionada com o desenvolvimento de carcinomas de células escamosas orais (Roychoudhury e Chaudhuri, 2007). Ganhos em **11p13** foram detectados em 9/27 AP. Nesta região encontra-se o gene *CD44* (11p13), que está envolvido em processos de interação célula-célula, adesão e migração celular. A interação entre o *CD44* em células epiteliais tumorais e seu ligante de hialurona na matriz extracelular tem sido relatada como um evento importante na progressão tumoral e metástase de diversos cânceres, incluindo cânceres de mama (Afify et al., 2009). Ganhos em **11p15** foram observados em 9/27 AP. O gene *TSG101* (11p15), atua na regulação do crescimento celular. A expressão

deste gene é regulada positivamente num subgrupo de cânceres de mama invasivos e a expressão elevada de *TSG101* em camundongos transgênicos revela fracas propriedades oncogênicas na iniciação de cânceres de mama (Oh et al., 2007). Outro gene candidato é o *HRAS* (11p15.5), um oncogene envolvido em uma variedade de carcinomas, incluindo carcinomas medulares da tireóide (Goutas et al., 2008). A ativação deste gene foi correlacionada com cânceres de mama invasivos (Shin et al., 2005). Ganhos em **12p11.2-p12** foram detectados em 9/27 AP. Nesta região está mapeado o gene *KRAS* (12p12.1), um oncogene que tem sido relacionado à diversos cânceres como adenocarcinoma de pulmão, carcinoma ductal de pâncreas, carcinoma colorretal, entre outros (Plessec e Hunt, 2009). Em **12p13** (ganhos em 8/27) está mapeado o gene *ETV6* (12p13), um fator de transcrição envolvido com rearranjos cromossômicos que tem sido associado a leucemias e fibrosarcomas congênitos (Iijima et al., 2002). Ganhos em **14q12** foram observados em 8/27 AP avaliados. Nesta região estão mapeados os genes *FOXA1* (14q12-q13), um fator de transcrição que tem sido relatado como suposto oncogene em carcinomas de tireóide (Nucera et al., 2009); e o gene *NEDD8* (14q12), que atua na regulação do ciclo celular e sua expressão elevada tem sido correlacionada com a progressão de carcinomas de células escamosas orais (Chairatvit e Ngamkitidechakul, 2007). Em **17p13** foram detectados ganhos em 9/27 AP. O gene *TNFSF13* (17p13.1), mapeado nesta região, tem papel na regulação positiva da proliferação celular e foi relatado envolvido na patogênese de glioblastomas multiformes atuando como marcador prognóstico (IŁzecka e IŁzecki, 2006). Ganhos em **17q25** foram observados em 7/27 AP. Nesta região está mapeado o gene *FASN* (17q25) que tem sido relatado com função de oncogene na presença do gene *AR* por inibir a via de apoptose intrínseca em carcinomas prostáticos (Migita et al., 2009). Ganhos em **18p11.2** (7/27), onde está mapeado o gene *CTAGE* (18p11.2), um antígeno tumoral, que tem sido detectado numa variedade de tumores como linfomas de células T cutâneos, melanomas, carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço, carcinomas de mama e carcinomas de cólon (Usener et al., 2003). Ganhos em **20q13.3** (7/27) coincidem com a localização do gene *EEF1A2* (20q13.3), um suposto oncogene tumoral que tem sido observado com expressão elevada em carcinomas pancreáticos (Cao et al., 2009). Foram observados ganhos em **22q13** em 8/27 AP. Nesta região está mapeado o proto-oncogene *PIM3* (22q13) que atua na progressão do ciclo celular e inibição da apoptose contribuindo para a tumorigênese (Morishita et al., 2008). Em **Xp22.1-p22.3** foram observados ganhos em 7/27 casos avaliados. Nesta região encontra-se o gene *SH3KBPI* (Xp22.1-p21.3) que atua em processos de sinalização célula-célula, adesão celular

e organização do citoesqueleto. Foi relatado que este gene complexado com o gene *AMAPI* está envolvido na invasão tumoral de cânceres de mama (Nam et al., 2007).

Para os **tumores de Warthin**, foram observados ganhos e perdas genômicas exclusivas. Perdas em **1p12** foram observadas em 7/11 casos avaliados. Nesta região está mapeado o gene *SLC16A1* (1p12) que está envolvido no transporte celular de substratos que induzem a diferenciação celular; e que foi observado com expressão reduzida em cânceres de mama (Asada et al., 2003). Perdas em **1q21-q23** (7/11) coincidem com a localização do gene *PYHINI* (1q23.1), que atua no controle do ciclo celular e que tem suposto papel de supressor tumoral em cânceres de mama (Ding et al., 2006). O gene *ANAPCI* (2q12.1) que atua no ciclo celular, divisão celular e mitose pode estar relacionado à perda genômica em **2q12** detectada em 8 de 11 TW analisados. Fujita et al. (2008) sugeriram que o complexo *CDHI/ANAPCI* atua na supressão tumoral de cânceres colorretais via regulação de *SKP2*, uma ubiquitinina ligase, crítica na regulação da transição G1/S do ciclo celular. Foram observados ganhos em **4q27** (3/11), onde está mapeado o gene *MAD2L1* (4q27), um *checkpoint* do ciclo celular, que foi observado com expressão elevada numa variedade de tumores, incluindo carcinomas hepatocelulares (Zhang et al., 2008). Em **5q21** foram detectados ganhos em 4/11 casos avaliados. Nesta região encontra-se o gene *FER* (5q21), que codifica uma tirosina quinase requerida para a progressão do ciclo celular em células tumorais malignas (Pasder et al., 2006). Ganhos em **7q21** foram detectados em 3/11 TW. Nesta região está mapeado o gene *HGF* (7q21.1) que atua como uma citoquina multifuncional que exerce papel importante em processos de motilidade celular, mitogênese, invasão da matriz extracelular, angiogênese, e regeneração tecidual. Este gene foi relacionado à formação e progressão de gliomas, promovendo a proliferação tumoral (Tu et al., 2009). Também foram observadas perdas em **12q13-q14** (10/11). O gene *WIF1* (12q14.3), atua como inibidor da via Wnt e tem sido proposto como supressor tumoral (Kansara et al., 2009). Queimado et al. (2007) relataram que a regulação negativa deste gene tem um papel importante no desenvolvimento e/ou progressão de adenomas pleomórficos da glândula salivar.

Tanto ganhos como perdas genômicas exclusivas foram freqüentemente observadas para os **carcinomas ex-adenomas pleomórficos**. Perdas em **2p12** foram observadas em 3/6 casos. O gene *HTRA2* (2p12), que atua principalmente em processos de apoptose, está mapeado nesta região e foi relatado como suposto supressor tumoral em cânceres de ovário (Narkiewicz et al., 2008). Ganhos em **2q33** foram detectados em 3/6 CXAP. Nesta região está mapeado o gene *ERBB4* (2q33.3-q34) que codifica um membro da família de receptores de fatores de crescimento epidermais. Foi relatado que este gene atua no desenvolvimento da

mama normal e do câncer de mama por regular a proliferação de células epiteliais mamárias, sobrevivência e diferenciação (Li et al., 2009). Ganhos em **2q36** foram observados em 3/6 CXAP. O gene *FEV* (2q36) mapeado nesta região atua como repressor transcricional e tem importante papel na diferenciação celular (Maurer et al., 2003). Nesta região está mapeado também o gene *EPHA4*, um receptor transmembrana de tirosina quinase, que tem sido correlacionado com desenvolvimento de metástases em cânceres colorretais e adenocarcinomas do ducto pancreático (Iiizumi et al., 2006; Oshima et al., 2008). Perdas em **3p12-p13** foram detectadas em 4/6 CXAP. O gene *ROBO1* mapeado em 3p12 atua na adesão e diferenciação celular. Este gene foi proposto como supressor tumoral em carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (Ghosh et al., 2009). Ganhos em **4q26** foram detectados em 3/6 casos. O gene *FGF2* (4q26-q27) é um candidato a estar envolvido nestes tumores por contribuir para a proliferação celular tumoral e angiogênese. Expressão elevada, mutações de ponto, variações de *splicing* e alterações genômicas de *FGF2* têm implicações no desenvolvimento de diversos cânceres (Ribatti et al., 2007). Ganhos em **4q34** foram detectados em 3/6 CXAP. Nesta região está mapeado o gene *VEGFC* (4q34.1-q34.3) que atua na angiogênese e no crescimento celular endotelial. Foi proposto seu papel na progressão tumoral por estimular a linfangiogênese em carcinomas de células não pequenas do pulmão (Guo et al., 2009). Perdas em **5q11.2** foram observadas em 4/6 CXAP. Nesta região está mapeado o gene *ITGAI* (5q11.2), que codifica uma integrina importante na adesão à matriz extracelular. Redução da expressão deste gene foi correlacionada com desprendimento da matriz extracelular e redução da atividade migratória de células humanas de neuroblastomas (Tanaka e Fukuzawa, 2008). Perdas em **5q15** foram detectadas em 3/6 casos. O gene *ANKRD32* (5q15), mapeado nesta região, atua como *checkpoint* no reparo a danos no DNA e também no controle do ciclo celular (Adams et al., 2005). Perdas em **6q14** foram observadas em 3/6 CXAP. O gene *SNORD50A* (6q14.3), mapeado nesta região, foi relatado com função de supressor tumoral em cânceres de mama e próstata (Dong et al., 2009). Perdas em **7p11.2** estavam presente em 50% dos CXAP (3/6 casos). Nesta região está mapeado o gene *SEPT14* que atua no transporte entre membranas, apoptose, polaridade celular, regulação do ciclo celular e outras funções celulares (Peterson et al., 2007). No cromossomo 8, foram observados ganhos freqüentes em **8p22** em 3/6 CXAP. O gene *NATI* (8p21.3-p23.1), mapeado nesta região, é uma acetil-transferase que atua em diversos processos metabólicos. Foi observada expressão elevada deste gene em linhagens celulares de cânceres de mama positivas para o receptor de estrógeno (Wakefield et al., 2008). Também foram detectados ganhos em **8q21.3-q22** em 3/6 casos avaliados, onde está mapeado o gene *ANGPT1* (8q22.3-q23) que tem papel

na angiogênese tumoral (Metheny-Barlow e Li, 2003). Perdas em **8q11.2** foram observadas em 3/6 CXAP. O gene *TCEA1* mapeado nesta região (8q11.2) participa do processo de alongação do RNA e da regulação da transcrição. Foi relatado que a translocação deste gene com *PLAG1*, ativa sua função oncogênica em adenomas pleomórficos de glândulas salivares (Asp et al., 2006). Perdas em **10p15** (3/6) coincidem com a localização do gene *KLF6*, um gene supressor tumoral envolvido em vários cânceres, incluindo câncer de próstata (Narla et al., 2001). No cromossomo 11, foram detectadas perdas em **11p11.2** em 5/6 CXAP. O gene supressor de metástase *CD82* (11p11.2) encontra-se mapeado nesta região. A perda ou expressão reduzida deste gene tem sido correlacionada com a progressão tumoral e desenvolvimento de metástase em vários cânceres sólidos (Chen et al., 2004). Foram detectadas perdas em **11q12** em 3/6 CXAP avaliados. O gene *PLA2G16* (11q12.3), mapeado nesta região, tem função de supressor tumoral e foi relatado com regulação negativa em vários carcinomas e linhagens celulares tumorais (Roder et al., 2002). Ganhos em **12q14-q15** (4/6), coincidem com a localização do gene *RAP1B* (12q14), um transdutor de sinal, que tem suposto papel na progressão de tumores malignos (Mittra et al., 2003). O gene *MDM2* (12q14.3-q15) também mapeado nesta região, atua no ciclo celular, apoptose e tumorigênese. A expressão elevada deste gene resulta na inativação de *TP53*, diminuindo sua função de supressor tumoral e promovendo assim a progressão tumoral (Vargas et al., 2003). O oncogene *RASSF3* (12q14.2) também está mapeado nesta região e foi relatado como mutado em diversos cânceres. Ganhos em **13q14** foram observados em 3/6 CXAP. Nesta região encontra-se mapeado o gene *NEK3* (13q14.13) que atua no ciclo celular, divisão celular e mitose. Polimorfismos de inserção e deleção neste gene foram associados com diversos cânceres (Hernández e Almeida, 2006). Perdas em **14q11.2** foram detectadas em 3/6 CXAP. Nesta região encontra-se o gene *NDRG2* (14q11.2), que está envolvido na diferenciação celular e supressão tumoral. Foi observada redução ou ausência da expressão deste gene em vários cânceres (Zhao et al., 2008). Perdas em **Xp11.4** foram observadas em 4/6 casos. Nesta região encontra-se mapeado o gene *TSPAN7*, importante na transdução de sinal de proteínas transmembranas e na regulação do desenvolvimento, ativação, crescimento e motilidade celular; não há relatos do envolvimento deste gene em câncer. Em **Xq12** foram detectadas perdas em 5/6 CXAP. O gene *EDA2R* (Xq12), localizado nesta região, foi relatado com função de supressor tumoral por prevenir a transformação maligna e progressão tumoral pela regulação da apoptose em tumores colorretais (Tanikawa et al., 2009).

Entre os **carcinomas adenóides císticos**, foram observados ganhos genômicos em **1q21** (4/6) exclusivamente para este tipo tumoral onde está mapeado o gene *RAB13* (1q21.2).

A proteína RAB13 atua na adesão celular e transporte protéico, podendo atuar na invasão e metástase (Kanda et al., 2008). Ganhos em **2q11.2-q14.1** (2/5) coincidem com a localização do gene *GLI2* (2q14), um fator de transcrição que atua como oncogene em vários cânceres, incluindo câncer de próstata (Thiyagarajan et al., 2007). Foram detectados ganhos também em **5q11.2-q12** (2/5). O gene *CCNB1* (5q12), mapeado nesta região, atua na progressão do ciclo celular e foi relatado com expressão elevada em carcinomas de células escamosas de esôfago, (Song et al., 2008). Nenhuma perda exclusiva foi observada para este tipo tumoral.

Foram detectados ganhos exclusivos nos **carcinomas mucoepidermóides**, incluindo ganhos em **1p32** (3/4), onde estão mapeados os genes *JUN* (1p31-p32) que foi relacionado aos processos de tumorigênese e metástase em cânceres de mama (Zhang et al., 2007); e *TACSTD2* (1p31-p32) que atua como oncogene em vários cânceres, incluindo câncer de cólon (Wang et al., 2008). Ganhos em **1q25** (2/4) coincidem com a localização do gene *TPR* (1q25), um importante *checkpoint* do ciclo celular (Lee et al., 2008). Perdas exclusivas foram observadas em **8q13** em 2/4 CME. O gene *TERF1*, mapeado nesta região, atua na manutenção dos telômeros, regulação do ciclo celular e divisão celular. Regulação negativa deste gene foi associada a carcinomas de células de não pequenas do pulmão (Hu et al., 2008). Ganhos da região **12q13** foram detectados em 2/4 casos. Nesta região está localizado o gene *ERBB3* que atua na proliferação e diferenciação celular. Amplificação e/ou expressão elevada deste gene foram relatadas numa variedade de cânceres, incluindo cânceres de mama, próstata, bexiga, carcinomas gástricos, entre outros (Hayashi et al., 2008).

Foram observadas perdas exclusivas para os **adenocarcinomas** em **6q15** (2/3). O gene *PNRC1*, mapeado nesta região, atua na regulação da transcrição. Foi observada uma diminuição da expressão deste gene em cânceres de mama quando comparado com tecido normal de mama, sugerindo que este gene suprime a regulação mediada por fatores nucleares e por fatores de crescimento em tecidos de mama humanos (Zhou et al., 2004). Nenhum ganho exclusivo foi observado para este tipo tumoral.

Entre os **carcinomas ductais salivares** foram observados ganhos exclusivos em **4p12-p13** (3/3). O gene *PHOX2A* (4p12), localizado nesta região, codifica um fator de transcrição que foi relatado com expressão elevada em neuroblastomas humanos (Longo et al., 2008). Ganhos em **9p12-p13** foram detectados nos três casos de CDS. Nesta região está mapeado o gene *BAG1* (9p12), que tem funções anti-apoptóticas. Expressão elevada deste gene foi correlacionada com carcinomas de cólon (Bai et al., 2007). Nenhuma perda exclusiva foi observada para este tipo tumoral.

Para os demais tipos tumorais (**oncocitomas e carcinomas epiteliais-mioepiteliais**) as alterações genômicas observadas foram comuns a outros TGS.

Perdas genômicas foram freqüentemente detectadas para os cromossomos 16, 17, 19, 22 e Y numa média de 83%, 72%, 70%, 69% e 17% dos casos de TSG, respectivamente; entretanto os ganhos genômicos foram menos freqüentes, observados somente nos cromossomos 17, 22 e Y numa média de 14%, 13% e 16% dos casos de TGS, respectivamente. Estes achados são coincidentes com os relatos de Cooper et al. (2007) de altas freqüências de variações no número de cópias para estes cromossomos.

No presente estudo, os genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* foram selecionados para a avaliação da expressão gênica nos adenomas pleomórficos. Foram observados ganhos exclusivos em **6p24-p25** em 8/27 (30%) casos de AP analisados pela HR-CGH. Nesta região está mapeado o gene *NEDD9*, que codifica uma proteína essencial para o comportamento pró-metastático de diversos tumores. A expressão diferencial deste gene foi associada com adenocarcinomas metastáticos de mama (Minn et al., 2005). O gene *NEDD9* é também um efetor específico da FAK-quinase pró-oncogênica e é requerido para a migração e invasão de glioblastomas agressivos (Natarajan et al., 2006). Mais recentemente, estudos de oncogenômica em larga escala identificaram o *NEDD9* como alvo de amplicon associado com melanomas metastáticos. Além disso, foi observada expressão elevada do mRNA e da proteína codificada por este gene numa porcentagem significativa de melanomas metastáticos, mesmo na ausência da amplificação gênica (Kim et al., 2006). Em adição, tem sido demonstrado que este gene tem papel relevante na maturação do sistema imune, artrite, trombose e em outras doenças (Singh et al., 2007).

Neste estudo, foi observado aumento da expressão do transcrito *NEDD9* em 17/37 (46%) casos de AP analisados por qRT-PCR em tempo real, em concordância com os achados da HR-CGH. Foi observada diferença estatisticamente significativa para o aumento de expressão do gene *NEDD9* ($P < 0,0001$) quando foram comparados os casos de AP com os controles (amostras normais). Foi observada também diferença entre os casos com expressão normal e aumentada ($P < 0,0001$). Não foi observada associação significativa para os parâmetros clínico-patológicos avaliados. O adenoma pleomórfico é a neoplasia benigna de glândula salivar com maiores chances de evoluir para transformação maligna, sendo o risco aumentado com o tempo de duração do tumor e com a idade do paciente. Além disso, não se sabe até o presente se o carcinoma ex-adenoma pleomórfico é uma neoplasia epitelial maligna que cresce no adenoma pleomórfico ou a partir dele; adicionalmente o CXAP freqüentemente apresenta metástases distantes e leva à morte do paciente dependendo do grau de invasividade

do tumor. Entre os oito casos avaliados pela HR-CGH que apresentaram ganho da região 6p24-25, dois casos apresentaram recidiva e/ou um segundo tumor primário. Adicionalmente, dos 17 pacientes com AP avaliados pela qRT-PCR em tempo real deste estudo que apresentaram idade superior ou igual a 45 anos (mediana da amostra), nove apresentaram expressão elevada do *NEDD9*. Os resultados deste estudo sugerem que ganhos desta região estariam associados a aumento da expressão do transcrito *NEDD9* e conseqüente progressão maligna e/ou pior prognóstico em AP. Assim, pelo menos em um subconjunto dos casos, ganhos genômicos estariam associados com aumento de expressão do transcrito. O número de casos avaliados é limitado mas o gene *NEDD9* mostrou-se um marcador interessante para estudos em um maior número de casos em AP.

Ganhos em **3p25** foram observados em 22% (6/27 casos) dos AP analisados pela HR-CGH; entretanto perdas genômicas também foram detectadas em 41% (11/27) dos casos. Nesta região está mapeado o gene *PPARG*, que atua como um fator de transcrição após a heterodimerização com o receptor X de retinóide e a ligação a elementos de resposta proliferativa específicos (Mangelsdorf e Evans, 1995). Este gene está envolvido no controle do ciclo celular, inflamação, aterosclerose, apoptose e carcinogênese (Auwerx, 1999). Em células tumorais, a ativação de *PPARG* por ligantes de alta afinidade pode induzir a diferenciação celular e inibir a proliferação celular (Motomura et al., 2004). Assim a ativação de *PPARG* induz a parada do crescimento de células tumorais. Recentemente, algumas pesquisas têm demonstrado que o inibidor de cinase dependente de ciclina pode ser uma molécula crucial durante este evento (Han et al., 2004). Numerosos estudos relataram que o *PPARG* pode induzir a diferenciação celular em liposarcomas humanos e células de câncer de mama. Pode também atuar como um inibidor do crescimento celular de vários carcinomas como de mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, bexiga, pâncreas, epitélio oral e glândula salivar (revisado em Hamakawa et al., 2008). Em cânceres humanos de cólon, mutações encontradas neste gene foram associadas com a perda de sua função (Sarraf et al., 1999). Os ligantes de *PPARG* podem diminuir o crescimento de células tumorais humanas da bexiga e a perda da sua expressão está associada com a progressão tumoral (Nakashiro et al., 2001). Estes achados sugerem um papel de supressor tumoral para este gene e um potencial alvo molecular para o tratamento do câncer (Hamakawa et al., 2008).

Na avaliação da expressão do transcrito *PPARG* por qRT-PCR em tempo real deste estudo, foi observado aumento de expressão em 14% (5/36) dos adenomas pleomórficos; entretanto, a diminuição da expressão de *PPARG* foi observada em 36% (11/36) dos casos. Estes resultados estão em concordância com os achados da HR-CGH (ganhos observados em

22% e perdas em 41% dos casos) em 3p25. Foi observada diferença estatisticamente significativa para a diminuição de expressão do gene *PPARG* ($P < 0,0001$) quando comparados casos e controles normais. Também foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os casos com expressão normal e expressão diminuída para o gene *PPARG* ($P < 0,0001$). Não foi observada diferença significativa na comparação dos achados com os parâmetros clínicos-patológicos. Entre os 11 casos avaliados por HR-CGH que apresentaram perda de 3p25, três casos apresentaram recidiva e/ou um segundo tumor primário. Adicionalmente, dos dois casos avaliados pela qRT-PCR em tempo real que apresentaram um segundo tumor primário, um caso teve expressão diminuída do *PPARG*. Estes resultados sugerem que a perda de 3p25 e consequente diminuição da expressão de *PPARG* podem estar associadas ao desenvolvimento e progressão dos adenomas pleomórficos.

Em **8q24.21**, foram observados ganhos em 11% dos AP (3/27) avaliados neste estudo pela HR-CGH. Nesta região está mapeado o gene *c-MYC*, um proto-oncogene relacionado à progressão de várias neoplasias, incluindo carcinomas da região da cabeça e pescoço (Spandidos et al., 1985). A análise da expressão do transcrito *c-MYC* por qRT-PCR em tempo real, foi observado aumento de expressão em 82% dos AP (24/28) analisados neste estudo. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre casos e controles quanto a expressão do *c-MYC* ($P = 0,0025$). Não foi observada diferença significativa entre a expressão do *c-MYC* e os parâmetros clínicos patológicos avaliados, concordante com os dados da literatura. Xue et al. (1993) relataram que 18/25 casos de AP apresentam amplificação e expressão elevada do *c-MYC*. Em outro estudo, foi observada expressão da proteína *c-MYC* em 42% dos AP e em 56% dos CXAP analisados, sugerindo o envolvimento deste gene na progressão maligna dos AP (Deguchi et al., 1993). Recentemente, Persson et al. (2009) também relataram a amplificação e expressão elevada do *c-MYC* em AP e CXAP, ressaltando a importância deste gene na progressão maligna desses tumores. Um dado interessante, é que dos três casos avaliados por HR-CGH que demonstraram ganhos desta região, um caso apresentou recorrência e um segundo tumor primário. Adicionalmente, os dois casos que apresentaram expressão elevada de *c-MYC* também tiveram um segundo tumor primário. O ganho desta região também foi observado por HR-CGH em 2/6 casos de CXAP deste estudo. Os resultados sugerem a importância da amplificação e expressão elevada deste gene no desenvolvimento e/ou progressão maligna dos adenomas pleomórficos. Nossos achados revelam que a amplificação do *cMYC* é um evento freqüente em adenomas pleomórficos.

Na análise comparativa dos seis casos de adenomas pleomórficos avaliados pela HR-CGH para as alterações no número de cópias genômicas e que também foram avaliados pela

qRT-PCR em tempo real para a expressão gênica, não houve concordância entre os achados de ganhos genômicos e o aumento de expressão dos transcritos *NEDD9*, *c-MYC* e *PPARG*. A ausência de correlação pode ter ocorrido pelo número limitado de casos avaliados ou pela baixa resolução da técnica de HR-CGH em detectar alterações em seqüências únicas. Entretanto, foi observada concordância entre a perda da região 3p25 e a diminuição de expressão do transcrito *PPARG* em um caso, reforçando o envolvimento da perda desta região e conseqüente diminuição da expressão de *PPARG* em um subgrupo de adenomas pleomórficos.

Foram selecionados os genes *CDHI* e *HRK* para a avaliação protéica nos tumores de Warthin deste estudo. Foram observadas perdas de regiões genômicas **16q22.1** e **12q24.22**, onde estão mapeados estes genes, respectivamente, nos 11 tumores de Warthin avaliados por HR-CGH.

O gene *CDHI*, codifica a proteína e-caderina, uma molécula importante na sinalização e adesão celular. A E-caderina tem ambas as funções de supressora de invasão e supressora tumoral (Van Aken et al., 2001). Perda da imuno-expressão de E-caderina foi observada numa variedade de cânceres invasivos como carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço e esôfago, carcinomas da tireóide, mama, próstata, bexiga, cérvix uterino, endométrio, cólon e pâncreas. Estas evidências sugerem que os efeitos da supressão de invasão da E-caderina são perdidos (Chetty e Serra, 2008). Perda da expressão protéica de E-caderina foi correlacionada com elevados graus e estágios do carcinoma lobular de mama (Gamalo et al., 1993). A ausência da expressão de E-caderina foi observada num subtipo histológico específico de câncer gástrico, o subtipo difuso (Becker et al., 1994). O maior paradigma da E-caderina atuando como supressora tumoral foi observado em carcinomas gástricos e de mama, sendo que foi observada a re-expressão desta proteína no êmbolo e na metástase destes carcinomas (Van Aken et al., 2001).

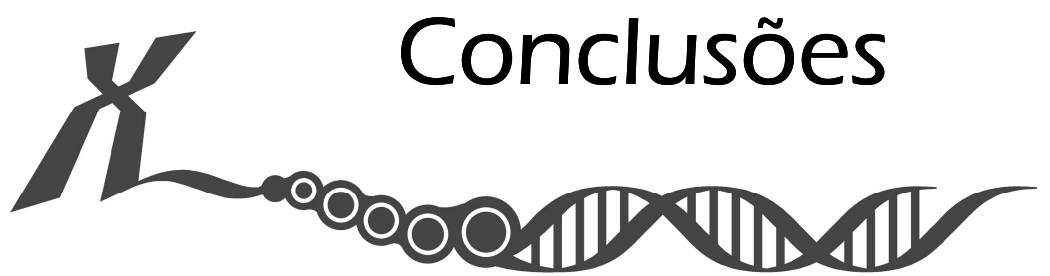
Na análise da expressão protéica por imuno-histoquímica, não foi observada ausência de expressão para a proteína CDH1 no tumor e nem nas glândulas normais adjacentes dos 47 casos de tumores de Warthin avaliados. Isto indica que o gene selecionado não corresponde à região genômica detectada deletada pela HR-CGH. Foi observado aumento de expressão protéica em 77% dos casos avaliados para a membrana tumoral e em 35% e 52% dos casos avaliados para os ductos e ácinos, respectivamente, presentes na glândula salivar normal adjacente a neoplasia benigna. Não foi observada associação significativa com os parâmetros clínico-patológicos avaliados.

O gene *HRK* tem importante papel na ativação da apoptose e inibição do crescimento celular (Inohara et al., 1997). Tem sido observado, em muitos tecidos, que reguladores apoptóticos têm papéis críticos na tumorigênese (Shimada et al., 2006). A redução da expressão deste gene foi relacionada à progressão tumoral por modular a morte celular (Inohara et al., 1997; Sunayama et al., 2004). Tem sido relatada a inativação de *HRK* em alguns tipos de cânceres, incluindo carcinomas gástricos, colorretais e prostáticos, glioblastomas e leucemias (Sanz et al., 2002; Obata et al., 2003; Nakamura et al., 2005; Higuchi et al., 2008).

Na análise de IHQ para o gene *HRK* deste estudo foi observada ausência de expressão em 31% dos casos de tumores de Warthin avaliados, em concordância com os achados da HR-CGH. Foi observado também uma diferença significativa entre a ausência de expressão da proteína e hábito tabagista ($P= 0,029$), uma associação não relatada previamente. Entre os 11 casos em que foi possível realizar as duas análises, HR-CGH e expressão da proteína, foram detectados resultados concordantes, ou seja, todos os casos mostraram perdas e conseqüente expressão diminuída da proteína (escores 0 e 1 para intensidade). Estes resultados sugerem o envolvimento da deleção e conseqüente diminuição da expressão deste gene no desenvolvimento em um subgrupo de tumores de Warthin.

Na análise comparativa dos onze casos avaliados pela HR-CGH para as alterações no número de cópias genômicas e que também foram avaliados por IHQ para a expressão protéica, não foi observada concordância da deleção da região 16q22.1 com a ausência de expressão da proteína CDH1. Entretanto, foi observada concordância da deleção da região 12q24.22 com a ausência da expressão da proteína *HRK* em 8/11 casos avaliados, reforçando o envolvimento da perda desta região e conseqüente diminuição da expressão deste transcrito em tumores de Warthin.

Os achados deste estudo pela metodologia da HR-CGH permitiram a identificação de alterações genômicas não casuais, bem como potenciais genes candidatos relacionados à fisiopatologia dos diferentes tipos histológicos de TGS. A detecção de regiões cromossômicas é uma etapa fundamental para identificação futura de genes relacionados ao desenvolvimento da doença e de marcadores moleculares para o seu diagnóstico.



Conclusões

Conclusões

- ✓ A detecção de regiões cromossômicas alteradas envolvidas em perdas e ganhos genômicos é uma etapa fundamental para a identificação de regiões genômicas relacionadas ao desenvolvimento da doença e de candidatos a marcadores moleculares;
- ✓ A análise pela HR-CGH revelou que os tumores de glândulas salivares apresentam alterações genômicas comuns a subgrupos de tumores como também específicas para cada tipo tumoral;
- ✓ Os achados deste estudo permitiram a identificação de alterações genômicas não casuais, bem como potenciais genes candidatos relacionados à fisiopatologia dos diferentes tipos histológicos de TGS;
- ✓ Os genes *NEDD9*, *PPARG* e *c-MYC* mostraram-se alterados em adenomas pleomórficos de glândulas salivares e confirmaram os resultados prévios obtidos de HR-CGH;
- ✓ Aumento da expressão do oncogene *c-MYC* foi detectada em uma frequência significativa de adenomas pleomórficos, indicando seu envolvimento nestes tumores.
- ✓ Perdas em 12q24.22 foram associadas a perda da expressão da proteína HRK em um subgrupo de tumores de Warthin.



Bibliografia

- ABOU-ELHAMD, K.E.; HABIB, T.N.; MOUSSA, A.E.; BADAWY, B.S. The role of genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 265:217-222, 2008.
- ADAMOWICZ, M.; RADLWIMMER, B.; RIEKER, R.J.; MERTENS, D.; SCHWARZBACH, M.; SCHRAML, P.; BENNER, A.; LICHTER, P.; MECHTERSHEIMER, G.; JOOS, S. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 45:829-838, 2006.
- ADAMS, D.J.; VAN DER WEYDEN, L.; GERGELY, F.V.; ARENDS, M.J.; NG, B.L.; TANNAHILL, D.; KANAAR, R.; MARKUS, A.; MORRIS, B.J.; BRADLEY, A. BRCTx is a novel, highly conserved RAD18-interacting protein. *Mol Cell Biol*, 25:779-788, 2005.
- AFIFY, A.; PURNELL, P.; NGUYEN, L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol*, 86:95-100, 2009.
- AGUIRRE, J.M., ECHEBARRFA, M. A., MARTINEZ-CONDE, R., RODRIGUEZ, C., BURGOS, J. J., RIVERA, J. M. Warthin tumor. A new hypothesis concerning its development. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 85:60-63, 1998.
- AJCC- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER: Manual for Staging of Cancer, 4th Ed. JB Lippincott, Philadelphia, 1992.
- ALLEN, R.C.; ZOGHBI, H.Y.; MOSELEY, A.B.; ROSENBLATT, H.M.; BELMONT, J.W. Methylation of Hpa II and Hha I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*, 51:1229-1239, 1992.
- ALVES, T.N.N.; SOARES, F.D.; SILVA JR, A.; MEDEIROS, N.; MILAGRES, A. Carcinoma adenóide cístico: revisão da literatura e relato de caso clínico. *J Bras Patol Med Lab*, 40:421-424, 2004.
- ARIDA, M.; BARNES, E.L.; HUNT, J.L. Molecular assessment of allelic loss in Warthin tumors. *Modern Pathology*, 18: 964-968, 2005.
- ASADA, K.; MIYAMOTO, K.; FUKUTOMI, T.; TSUDA, H.; YAGI, Y.; WAKAZONO, K.; OISHI, S.; FUKUI, H.; SUGIMURA, T.; USHIJIMA, T. Reduced expression of GNA11 and silencing of MCT1 in human breast cancers. *Oncology*, 64:380-388, 2003.
- ASP, J.; PERSSON, F.; KOST-ALIMOVA, M.; STENMAN, G. CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 Gene Fusions Resulting from Cryptic, Intrachromosomal 8q Rearrangements in Pleomorphic Salivary Gland Adenomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 45:820-828, 2006.
- ASTROM, A.K.; VOZ, M.L.; KAS, K.; ROIJER, E.; WEDELL, B.; MANDAHN, N.; VAN DE VEN, W.; MARK, J.; STENMAN, G. Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Res*, 59:918-23, 1999.
- AUCLAIR, P. L.; GOODE, R.K.; ELLIS, G. L. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. *Cancer*, 69:2021-2030, 1992.
- AUWERX, J. PPARg, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*, 42:1033-1049, 1999.
- AYOUB, O.; BHATIA, K.; MAL, R. Pleomorphic adenoma of the parotid gland: is long-term follow-up needed? *Auris Nasus Larynx*, 29:283, 2002.
- BAI, Y.X.; YI, J.L.; LI, J.F.; SUI, H. Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma. *World J Gastroenterol*, 13:3883-3885, 2007.
- BARBASH, O.; ZAMFIROVA, P.; LIN, D.I.; CHEN, X.; YANG, K.; NAKAGAWA, H.; LU, F.; RUSTGI, A.K.; DIEHL, J.A. Mutations in Fbx4 inhibit dimerization of the SCF(Fbx4) ligase and contribute to cyclin D1 overexpression in human cancer. *Cancer Cell*, 14:68-78, 2008.
- BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHAERT, P.; SIDRANSKY, D. WHO (World Health Organization Classification of tumors) -

- Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, 1^a ed, 2005.
- BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. A. Histopathologic grading of salivary gland neoplasm: I. Mucoepidermoid carcinoma. *Ann. Otol Rhinol Laryngol*, 99:835-838, 1990.
- BATSAKIS, J.G. Pathology of pathology of Pharyngeal Tumors. In: *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors*. Saunders, W. B. 1999.
- BAUMFORTH, K.R.N.; NELSON, P.N.; DIGBY, J.E.; O'NEIL, J.D.; MURRAY, P.G. The polymerase chain reaction. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 52: 1-10, 1999.
- BECKER, K.F., ATKINSON, M.J.; REICH, U.; NEKARDA, H.; SIEWERT, J.R.; HÖFLER, H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*, 54:3845-3852, 1994.
- BELL, D.; LUNA, M.A.; WEBER, R.S.; KAYE, F.J.; EL-NAGGAR, A.K. CRTC1/MAML2 Fusion Transcript in Warthin's Tumor and Mucoepidermoid Carcinoma: Evidence for a Common Genetic Association. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 47:309-314, 2008.
- BENTZ, M.; PLESH, A.; STILGENBAUER, S.; DOHNER, H.; LICHTER, P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genome hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 21:171-175, 1998.
- BIENZ, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci*, 31:35-40, 2006.
- BLONS, H.; LACCOURREYE, O.; HOULLIER, A.M.; CARNOT, F.; BRASNU, D.; BEAUNE, P.; ZUCMAN-ROSSI, J.; LAURENT-PUIG, P. Delineation and candidate gene mutation screening of the 18q22 minimal region of deletion in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene*, 21:5016-5023, 2002.
- BOISSAN, M.; POUPON, M.F.; LACOMBE, M.L. NM23 and metastasis suppressor genes: *Med Sci (Paris)*, 23:1115-1123, 2007.
- BRADLEY, P.J. Metastasizing pleomorphic salivary adenoma should now be considered a low-grade malignancy with a lethal potential. *Curr opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 13:123-126, 2005.
- BULLERDIEK, J.; HAUBRICH, J.; MEYER, K.; BARTNITZKE, S. Translocation t(11;19)(q21;p13.1) as the sole chromosome abnormality in a cystadenolymphoma (Warthin's tumor) of the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet*, 35:129-132, 1988.
- BULLERDIEK, J.; RAABE, G.; BARTNITZKE, S.; BOSCHEN, C.; SCHLOOT, W. Structural rearrangements of chromosome Nr 8 involving 8q12: A primary event in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Genetica*, 72:85-92, 1987.
- BULLERDIEK, J.; WOBST, G.; MEYER-BOLTE, K.; CHILLA, R.; HAUBRICH, J.; THODE, B.; BARTNITZKE, S. Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet*, 65:27-31, 1993.
- CAMILLERI, I. G.; MALATA, C. M.; McLEAN, N. R.; KELLY, C. G. Malignant tumours of the submandibular salivary gland: a 15-year review. *Br J Plast Surg*, 51:181-185, 1998.
- CAO, H.; ZHU, Q.; HUANG, J.; LI, B.; ZHANG, S.; YAO, W.; ZHANG, Y. Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 380:11-16, 2009.
- CARDOSO, S.V.; SOUZA, K.C.N.; FARIA, P.R.; LIMA, R.A.; NASCIMENTO, M.F.; EISENBERG, A.L.A.; DIAS, F.L.; LOYOLA, A.M. Warthin's Tumor at the Brazilian National Cancer Institute: Additional Evidence of Homogeneous Sex Prevalence and Association with Other Neoplasms, 70:339-343, 2008.
- CASTRO, G.A.; TIAGO, R.S.L.; SILVA, D.A.; MACHADO, M.C.; FUKUDA, Y.; FAVA, A.S. Tumor de Warthin de Glândula Parótida. *Rev Arq de Otorrinolaringol*, 8:272, 2004.
- CHAIRATVIT, K.; NGAMKITIDECHAKUL, C. Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Biochem*, 306:163-169, 2007.
- CHANNAVAJHALA, P.L.; WU, L.; CUOZZO, J.W.; HALL, J.P.; LIU, W.; LIN, L.L.; ZHANG, Y. Identification of a novel human kinase supporter of Ras (hKSR-2) that functions as a negative

- regulator of Cot (Tpl2) signaling. *J Biol Chem*, 278:47089-47097, 2003.
- CHEN, Z.; MUSTAFA, T.; TROJANOWICZ, B.; BRAUCKHOFF, M.; GIMM, O.; SCHMUTZLER, C.; KÖHRLE, J.; HOLZHAUSEN, H.J.; KEHLEN, A.; KLONISCH, T.; FINKE, R.; DRALLE, H.; HOANG-VU, C. CD82, and CD63 in thyroid cancer. *Int J Mol Med*, 14:517-527, 2004.
- CHETTY, R.; SERRA, S. NUCLEAR E-cadherin Immunoeexpression. From: *Biology to Potential Applications in Diagnostic Pathology. Adv Anat Pathol*, 15:234-240, 2008.
- CHIDZONGA, M.M.; LOPEZ PEREZ, V.M.; PORTILLA ALVAREZ, A.L. Pleomorphic adenoma of the salivary glands. Clinicopathologic study of 206 cases in Zimbabwe. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 79:747-749, 1995.
- CLOOS, P.A.; CHRISTENSEN, J.; AGGER, K.; MAIOLICA, A.; RAPPSILBER, J.; ANTAL, T.; HANSEN, K.H.; HELIN, K. The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, 442:307-311, 2006.
- COLLINS, K. Physiological assembly and activity of human telomerase complexes. *Mech Ageing Dev*, 129:91-98, 2008.
- COOPER, G.M.; NICKERSON, D.A.; EICHLER, E. E. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet*, 39:22-29, 2007.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Patologia estrutural e funcional, Robbins Patologia Estrutural e funcional, 6ª ed., p.692-695, 2000.
- DA SILVA, E.J.; PEREIRA, A.L.; FONTORA, M.C.; DE SOUZA, L.B.; DE ALMEIDA, F.R. Myoepithelioma of minor salivary gland—an immunohistochemical analysis of four cases. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 72:528-532, 2006.
- DANESHBOD, Y.; NEGAHBAN, S.; KHADEMI, B.; DANESHBOD, K. Epithelial myoepithelial carcinoma of the parotid gland with malignant ductal and myoepithelial components arising in a pleomorphic adenoma: a case report with cytologic, histologic and immunohistochemical correlation. *Acta Cytol*, 51:807-813, 2007.
- DARDICK, I.; BURFORD-MASON, A.P.; GARLICK D.S.; CARNEY W.P. The pathobiology of salivary gland II. Morphological evaluation of acinic cell carcinomas in the parotid gland of male transgenic (MMTV/v-Ha-ras) mice as a model for human tumours. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat*, 421:105-113, 1992.
- DARDICK, I.; CAVELL, S.; BOIVIN, M.; HOPPE, D.; PARKS, W.R.; STINSON, J.; YAMADA, S.; BURNS, B.F. Salivary gland myoepithelioma variants. Histological, ultrastructural, and immunocytological features. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 416:25-42, 1989.
- DARDICK, I.; VAN NOSTRAND, A.W.P.; PHILLIPS, M.J. Histogenesis of salivary gland pleomorphic adenoma (mixed tumor) with an evaluation of the role of myoepithelial cell. *Hum Pathol*, 13:62-75, 1982.
- DEBIEC-RYCHTER, M.; VAN VALCKENBORGH, I.; VAN DEN BROECK, C.; HAGEMEIJER, A.; VAN DE VEN, W. J. M.; KAS, K.; B VAN DAMME, B.; VOZ M.L. Histologic Localization of PLAG1 (Pleomorphic adenoma gene 1) in pleomorphic adenoma of the salivary gland: cytogenetic evidence of common origin of phenotypically diverse cells. *Lab Invest*, 81:1289-1297, 2001.
- DECKERS, M.; VAN DINTHER, M.; BUIJS, J.; QUE, I.; LOWIK, C.; VAN, DER.; LUIJM, G.; TEN DIJKE, P. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res*, 66:2202-2209, 2006.
- DECLERCQ, J.; VAN DYCK, F.; BRAEM, C.V.; VAN VALCKENBORGH, I.C.; VOZ, M.; WASSEF, M.; SCHOONJANS, L.; VAN DAMME, B.; FIETTE, L.; VAN DE VEN, W.J.M. Salivary Gland Tumors in Transgenic Mice with Targeted PLAG1 Proto-Oncogene Overexpression. *Cancer Res*, 65:4544-4553, 2005.
- DEGUCHI, H.; HAMANO, H.; HAYASHI, Y. c-myc, ras p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant

- form of the human salivary glands. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 70:35-40, 2004.
- DI PALMA, S.; LAMBROS, M.B.K.; SAVAGE, K.; JONES, C.; MACKAY, A.; DEXTER, T.; IRAVANI, M.; FENWICK, K.; ASHWORTH, A.; REIS-FILHO, J.S. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 60:1067-1068, 2007.
- DI PALMA, S.; SKÁLOVÁ, A.; VANIEEK, T.; SIMPSON, R. H. W.; STÁREK, I.; LEIVO, I. Non-invasive (intracapsular) carcinoma ex pleomorphic adenoma: recognition of focal carcinoma by HER-2/neu and MIB1 immunohistochemistry. *Histopathology*, 46:144-152, 2005.
- DING, Y.; LEE, J.F.; LU, H.; LEE, M.H.; YAN, D.H. Interferon-inducible protein IFIX α functions as a negative regulator of HDM2. *Mol Cell Biol.*, 26:1979-1996, 2006.
- DONG, X.Y.; GUO, P.; BOYD, J.; SUN, X.; LI, Q.; ZHOU, W.; DONG, J.T. Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J Genet Genomics*, 36:447-454, 2009.
- DUNLEAVY, E.M.; ROCHE, D.; TAGAMI, H.; LACOSTE, N.; RAY-GALLET, D.; NAKAMURA, Y.; DAIGO, Y.; NAKATANI, Y.; ALMOUZNI-PETTINOTTI, G. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*, 1:137:485-497, 2009.
- EDDY, R. L.; MENDOLA, C. E.; FAIRHURST, J. L.; SHOWS, T. B.; O'HARA, B.; KOVESDI, I.; BACKER, J. M. Metastasis suppressor gene is mapped to human chromosome 17p11-qter. *Cytogenet Cell Genet*, 58:2005, 1991.
- ELLIS, G.L.; AUCLAIR, P.L.; GNEPP, D.R. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia: WB Saunders, 1991.
- ELLIS, G.L.; AUCLAIR, P.L.: *Tumours of the salivary glands*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1996.
- ELLIS, G.L. Lymphoid lesions of salivary glands: malignant and benign. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal*, 12:479-485, 2007.
- EL-NAGGAR, A.K.; CALLENDER, D.; COOMBES, M.M.; HURR, K.; LUNA, M.A.; BATSAKIS, J.G. Molecular Genetic Alterations in Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma: A Putative Progression Model? *Genes, Chromosomes & Cancer*, 27:162-168, 2000.
- EL-NAGGAR, A.K.; HURR, K.; KAGAN, J.; GILLENWATER, A.; CALLENDAR, D.; LUNA, M.A.; BATSAKIS, J.G. Genotypic alterations in benign and malignant salivary gland tumors: histogenetic and clinical implications. *Am J Surg Pathol*, 21:691-687, 1997.
- EL-NAGGAR, A.K.; LOVELL, M.; CALLENDER, D.L.; ORDONEZ, N.G.; KILLARY, A.M. Concurrent Cytogenetic, Interphase Fluorescence In Situ Hybridization and DNA Flow Cytometric Analyses of a Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma of Parotid Gland. *Cancer Genet Cytogenet*, 107:132-136, 1998.
- EL-RIFAI, W.; RUTHERFORD, S.; KNUUTILA, S.; FRIERSON JR, H.F.; MOSKALUK, C.A. Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12-q13 in adenoid cystic carcinoma. *Neoplasia*, 3:173-178, 2001.
- ENAMORADO, I.; LAKHANI, R.; KORKMAZ, H.; YOO, G.H.; ALONSO, M.D.M.; PIETRASZKIEWICZ, H.; MACIOROWSKI, Z.; KIM, H.; KUCUK, O.; JACOBS, J.R.; ENSLEY, J.F. Correlation of histopathological variants, cellular DNA content, and clinical outcome in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 131:646-650, 2004.
- ENEROTH, C-M. Incidence and prognosis of salivary-gland tumors at different histologic sites. *Acta Otolaryngol*, 263:174-178, 1970.
- ENEROTH, C-M. Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland, and the palate region. *Cancer*, 27:1415-1418, 1971.
- ENLUND, F.; BEHBOUDI, A.; ANDREN, Y.; OBERG, C.; LENDAHL, U.; MARK, J.; STENMAN, G. Altered Notch signaling resulting from expression of a WAMTP1-MAML2 gene fusion in mucoepidermoid carcinomas and benign Warthin's tumors. *Exp Cell Res*, 292:21-28, 2004.
- EVANS, H.L. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a study of 69 cases with special attention to histologic grading. *Am J Clin Pathol*, 81:696-701, 1984.
- EVESON J.W.; CAWSON R.A. Salivary gland tumors: A review of 2,410 cases with particular reference to histologic

- types, site, age and sex distribution. *J Pathol*, 146:51-58, 1985.
- FENG, S.; AGOULNIK, I.U.; BOGATCHEVA, N.V.; KAMAT, A.A.; KWABI-ADDO, B.; LI, R.; AYALA, G.; ITTMANN, M.M.; AGOULNIK, A.I. Relaxin promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*, 13:1695-1702, 2007.
- FONSECA, I.; FELIX, A.; SOARES, J. Cell proliferation in salivary gland adenocarcinoma with myoepithelial participation. A study of 78 cases. *Virchows Arch*, 430:227-232, 1997.
- FOWLER, M.H.; FOWLER, J.; DUCATMAN, B.; BARNES, L.; HUNT, J.L. Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. *Modern Pathology*, 19:350-355, 2006.
- FREIER, K.; FLECHTENMACHER, C.; WALCH, A.; OHL, S.; DEVENS, F.; BURKE, B.; HASSFELD, S.; LICHTER, P.; JOOS, S.; HOFELE, C. Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, 159:89-95, 2005.
- FREITAS, L.L.L.; ARAÚJO, V.C.; MARTINS, M.T.; CHONE, C.; CRESPO, A.; ALTEMANI, A. Transformation Biomarker Analysis in Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma at an Early Phase of Carcinomatous. *Int J Surg Pathol*, 13:337, 2005.
- FUJITA, T.; LIU, W.; DOIHARA, H.; WAN, Y. Regulation of Skp2-p27 axis by the Cdh1/anaphase-promoting complex pathway in colorectal tumorigenesis. *Am J Pathol*, 173:217-228, 2008.
- GAMALLO, C.; PALACIOS, J.; SUAREZ, A.; PIZARRO, A.; NAVARRO, P.; QUINTANILLA, M.; CANO, A. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol*, 142:987-993, 1993.
- GATES, G.A. Malignant neoplasm of the minor salivary glands. *N Engl J Med*, 306:718-722, 1982.
- GEBHART E. Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res (Review)*, 104:352-358, 2004.
- GEBHART, E.; LIEHR, T.; WOLFF, E.; WILTFANG, J.; KOSCIELNY, S.; RIES, J. Loss of 9p21 is embedded in a complex but consistent pattern of genomic imbalances in oral squamous cell carcinomas. *Cytogenet Genome Res*, 101:106-112, 2003.
- GEURTS, J.M.; SCHOENMAKERS, E.F.; ROIJER, E.; STENMAN, G.; VAN DE VEN, W.J. Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Res*, 57:13-17, 1997.
- GHOSH, S.; GHOSH, A.; MAITI, G.P.; ALAM, N.; ROY, A.; ROYCHOUDHURY, S.; PANDA, C.K. Alterations of ROBO1/DUTT1 and ROBO2 loci in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic implications. *Hum Genet*, 125:189-198, 2009.
- GIEFING, M.; WIERZBICKA, M.; RYDZANICZ, M.; CEGLA, R.; KUJAWSKI, M.; SZYFTER, K. Chromosomal gains and losses indicate oncogene and tumor suppressor gene candidates in salivary gland tumors. *Neoplasma*, 55:55-60, 2008.
- GILLENWATER, A.; HURR, K.; WOLF, P.; BATSAKIS, J.G.; GOEPFERT, H.; ELNAGGAR, A.K. Microsatellite alterations at chromosome 8q loci in pleomorphic adenoma. *Otorhinolaryngology*, 177:448-452, 1997.
- GNEPP, D.R. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. *Pathol Annu*, 28:279-328, 1993.
- GOUTAS, N.; VLACHODIMITROPOULOS, D.; BOUKA, M.; LAZARIS, A.C.; NASIOULAS, G.; GAZOULI, M. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res*, 28:305-308, 2008.
- GRADY, W.M. Transforming growth factor-beta, Smads and cancer. *Clin. Cancer Res*, 11:3151-3154, 2005.
- GRÖNE, J.; DOEBLER, O.; LODDENKEMPER, C.; HOTZ, B.; BUHR, H.J.; BHARGAVA, S. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 15:1437-1443, 2006.
- GUO, X.; CHEN, Y.; XU, Z.; XU, Z.; QIAN, Y.; YU, X. Prognostic significance of

- VEGF-C expression in correlation with COX-2, lymphatic microvessel density, and clinicopathologic characteristics in human non-small cell lung cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*, 41:217-222, 2009.
- HAHN, S.A.; BARTSCH, D.; SCHROERS, A.; GALEHDARI, H.; BECKER, M.; RAMASWAMY, A.; SCHWARTE-WALDHOFF, I.; MASCHEK, H.; SCHMIEGEL, W. Mutations of the *dpc4/smad4* gene in biliary tract carcinoma. *Cancer Res*, 58:1124-1126, 1998.
- HALL, P.A.; GOING, J.J. Predicting the future: a critical appraisal of prognosis studies. *Histopathology*, 35:489-494, 1999.
- HAMAKAWA, H.; NAKASHIRO, K.; SUMIDA, T.; SHINTANI, S.; MYERS, J.N.; TAKES, R.P.; RINALDO, A.; FERLITO, A. Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head&Neck*, 30:800-809, 2008.
- HAMPER, K.; MAUSCH, H.E.; CASELITZ, J.; ARPS, H.; BERGER, J.; ASKENSTEN, U.; AUER, G.; SEIFERT, G. Acinic cell carcinoma of the salivary glands: the prognostic relevance of DNA cytophotometry in a retrospective study of long duration (1965-1987). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 69:68-75, 1990.
- HAN, S.; SIDELL, N.; FISHER, P.B.; ROMAN, J. Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human lung carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 10:1911-1919, 2004.
- HAN, X.; ZHANG, H.; JIA, M.; HAN, G.; JIANG, W. Expression of TIMP-3 gene by construction of a eukaryotic cell expression vector and its role in reduction of metastasis in a human breast cancer cell line. *Cell Mol Immunol*, 1:308-310, 2004.
- HANNA E.Y.; SNEN, Y. Neoplasms of the salivary glands. In: Bailey, B.; Fredrickson, S.M.; Harker, L.A.; Krause, C.J.; Schuller, D.E. (eds.). *Otolaryngology-head and neck surgery*, v.2, 2nd ed., p. 3. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001.
- HAYASHI, M.; INOKUCHI, M.; TAKAGI, Y.; YAMADA, H.; KOJIMA, K.; KUMAGAI, J.; KAWANO, T.; SUGIHARA, K. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 14:7843-7849, 2008.
- HEALEY, W. V.; PERZIN, K.H.; SMITH, L. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. Classification, clinical-pathologic correlation and results of treatment. *Cancer*, 26:368-388, 1970.
- HERNÁNDEZ, M.; ALMEIDA, T.A. Is there any association between *nek3* and cancers with frequent 13q14 deletion? *Cancer Invest*, 24:682-688, 2006.
- HIGUCHI, T.; NAKAMURA, M.; SHIMADA, K.; ISHIDA, E.; HIRAO, K.; KONISHI, N. HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer. *Prostate*, 68:105-113, 2008.
- HOLST, V.A.; MARSHALL, C.E.; MOSKALUK, C.A.; FRIERSON JR, H.F. KIT protein expression and analysis of *c-kit* gene mutation in adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol*, 12:956-960, 1999.
- HONDA, K.; KASHIMA, K.; DAA, T.; YOKOYAMA, S.; NAKAYAMA, I. Clonal analysis of the epithelial component of Warthin's tumor. *Hum Pathol*, 31:1377-1380, 2000.
- HOWLIN, J.; ROSENKVIST, J.; ANDERSSON, T. TNK2 preserves epidermal growth factor receptor expression on the cell surface and enhances migration and invasion of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 10:36, 2008.
- HU, J.; SUN, L.I.; CHONG, Z.; ZHOU, X.L. Expression of telomeric repeat binding factor 1 protein in nonsmall cell lung cancer with human telomerase reverse transcriptase positive. *Int J Surg Pathol*, 16:414-418, 2008.
- HU, J.; SUN, LI.; ZHANG, C.; ZHOU, X.L. Expression of telomeric repeat binding factor 1 protein in nonsmall cell lung cancer with human telomerase reverse transcriptase positive. *Int J Surg Pathol*, 16:414-418, 2008.
- HUH, K.H.; HEO, M.S.; LEE, S.S.; CHOI, S.C. Three new cases of salivary duct carcinoma in the palate: a radiologic investigation and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95:752-760, 2003.
- HUNGERMANN, D.; KORSCHING, E.; BÜRGER, H.; RÖSER, K.; LÖNING, T.; HERBST, H. Salivary duct carcinomas comprise phenotypically and genotypically

- diverse high grade neoplasms. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 90:168-176, 2006.
- HUNGERMANN, D.; ROESER, K.; BUERGER, H.; JÄKEL, T.; LÖNING, T.; HERBST, H. Relative paucity of gross genetic alterations in myoepitheliomas and myoepithelial carcinomas of salivary glands. *J Pathol*, 198:487-494, 2002.
- HUNGERMANN, D.; ROESER, K.; BUERGER, H.; JÄKEL, T.; LÖNING, T.; HERBST, H. Myoepithelial tumors of salivary glands. *Pathologe*, 26:339-344, 2005.
- IHRLER, S.; WEILER, C.; HIRSCHMANN, A.; SENDELHOFERT, A.; LANG, S.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; ARNOLD, G.; ZIETZ, C.; HARRISON, J.D. Intraductal carcinoma is the precursor of carcinoma ex pleomorphic adenoma and is often associated with dysfunctional p53. *Histopathology*, 51:362-371, 2007.
- IIIZUMI, M.; HOSOKAWA, M.; TAKEHARA, A.; CHUNG, S.; NAKAMURA, T.; KATAGIRI, T.; EGUCHI, H.; OHIGASHI, H.; ISHIKAWA, O.; NAKAMURA, Y.; NAKAGAWA, H. EphA4 receptor, overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma, promotes cancer cell growth. *Cancer Sci*, 97:1211-1216, 2006.
- IIJIMA, Y.; OKUDA, K.; TOJO, A.; TRI, N.K.; SETOYAMA, M.; SAKAKI, Y.; ASANO, S.; TOKUNAGA, K.; KRUIH, G.D.; SATO, Y. Transformation of Ba/F3 cells and Rat-1 cells by ETV6/ARG. *Oncogene*, 21:4374-4383, 2002.
- IŁZECKA, J.; IŁZECKI, M. APRIL is increased in serum of patients with brain glioblastoma multiforme. *Eur Cytokine Netw*, 17:276-80, 2006.
- INOHARA, N.; DING, L.; CHEN, S. NÚÑEZ, G. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J*, 16: 1686-1694, 1997.
- ITO, F.A.; ITO, K.; VARGAS, P.A.; ALMEIDA, O.P.; LOPES, M.A.; Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Maxillofac Surg*, 34:533-536, 2005.
- JIN, C.; MARTINS, C.; JIN, Y.; WIEGANT, J.; WENNERBERG, J.; DICTOR, M.; GISSELSSON, D.; STROMBECK, B.; FONSECA, I.; MITELMAN, F.; TANKE, H.J.; GLUND, M.H.; MERTENS, F. Characterization of Chromosome Aberrations in Salivary Gland Tumors by FISH, Including Multicolor Cobra-Fish. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 30:161-167, 2001.
- JIN, Y.; JIN, C.; ARHEDEN, K.; LARSSON, O.; BAUER, H.F.; MANDAHL, N.; MERTENS, F. Unbalanced chromosomal rearrangements in a metastasizing salivary gland tumour with benign histology. *Cancer Genet Cytogenet*, 102:59-64, 1998.
- JIN, Y.; JIN, C.; WENNERBERG, J.; HOGLUND, M.; MERTENS, F. *Cancer Genet Cytogenet*, 15, 111-117, 2001.
- JOHNS III, M.M. Salivary Glands Neoplasms. Disponível em <http://www.emedicine.com/ent/topic679.html>. Acessado em 25 de setembro de 2009.
- JOHNS, M.M.; WESTRA, W.H.; CALIFANO, J.A.; EISELE, D.; KOCH, W.M.; SIDRANSKY, D. Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Res*, 56:1151-1154, 1996.
- JONES III, M.M.; WESTRA, W.H.; CALIFANO, J.A.; EISELE, D.; KOCH, W.M.; SIDRANSKY, D. Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Res*, 56: 1151-1154, 1996.
- JONES, D.C.E.; BAITON, R. Adenoid cystic carcinoma of the palate in a 9-year-old boy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 69:483-486, 1990.
- JÖNSSON, G.; BENDAHL, P.O.; SANDBERG, T.; KURBASIC, A.; STAAF, J.; SUNDE, L.; CRÜGER, D.G.; INGVAR, C.; OLSSON, H.; BORG, A. Mapping of a novel ocular and cutaneous malignant melanoma susceptibility locus to chromosome 9q21.32. *J Natl Cancer Inst*, 21:97:1377-1382, 2005.
- KALLIONIEMI, O-P.; KALLIONIEMI, A.; PIPER, J.; ISOLA, J.; WALDMAN, F.M.; GRAY, J.W.; PINKEL, D. Optimizing comparative genomic hybridization for the analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10:231-243, 1994.
- KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O-P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J. W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258: 818-821, 1992.

- KANDA, I.; NISHIMURA, N.; NAKATSUJI, H.; YAMAMURA, R.; NAKANISHI, H.; SASAKI, T. Involvement of Rab13 and JRAB/MICAL-L2 in epithelial cell scattering. *Oncogene*, 27:1687-1695, 2008.
- KANDASAMY, J.; SMITH, A.; DIAZ, S.; ROSE, B.; O'BRIEN, C. Heterogeneity of PLAG1 gene rearrangements in pleomorphic adenoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 177:1-5, 2007.
- KANSARA, M.; TSANG, M.; KODJABACHIAN, L.; SIMS, N.A.; TRIVETT, M.K.; EHRICH, M.; DOBROVIC, A.; SLAVIN, J.; CHOONG, P.F.; SIMMONS, P.J.; DAWID, I.B.; THOMAS, D.M. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J Clin Invest*, 119:837-851, 2009.
- KAS, K.; VOZ, M.L.; HENSEN, K.; MEYEN, E.; VAN DE VEN, W.J. Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem*, 273:23026-23032, 1998.
- KAS, K.; VOZ, M.L.; ROIJER, E.; ASTROM, A.K.; MEYEN, E.; STENMAN, G.; VAN DE VEN, W.J. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet*, 15:170-174, 1997.
- KASAMATSU, A.; ENDO, Y.; UZAWA, K.; NAKASHIMA, D.; KOIKE, H.; HASHITANI, S.; NUMATA, T.; URADE, M.TANZAWA, H. Identification of candidate genes associated with salivary adenoid cystic carcinomas using combined comparative genomic hybridization and oligonucleotide microarray analyses. *Int J Biochem Cell Biol*, 37:1869-1880, 2005.
- KIM, M.; GANS, J.D.; NOGUEIRA, C.; WANG, A.; PAIK, J.H.; FENG, B.; BRENNAN, C.; HAHN, W.C.; CORDON-CARDO, C.; WAGNER, S.N.; FLOTTE, T.J.; DUNCAN, L.M.; GRANTER, S.R.; CHIN, L. Comparative oncogenomics identifies EDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell*, 125:1269-1281, 2006.
- KIRCHHOFF, M.; GERDES, T.; MAAHR, J.; ROSE, H.; BENTZ, M.; DOHNER, H.; LUNDSTEEN, C. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer*, 25:410-413, 1999.
- KIRCHHOFF, M.; GERDES, T.; MAAHR, J.; ROSE, H.; LUNDSTEEN, C. Automatic correction of the interfering effect of unsuppressed interspersed repetitive sequences in comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry*, 28: 130-134, 1997.
- KIRCHHOFF, M.; GERDES, T.; ROSE, H.; MAAHR, J.; ORRESEN, A.M.; LUNDSTEEN, C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry*, 31:163-173, 1998.
- KIRCHHOFF, M.; ROSE, H.; LUNDSTEEN, C. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *J Med Genet*, 38:740-744, 2001.
- KISHI, M.; NAKAMURA, M.; NISHIMINE, M.; ISHIDA, E.; SHIMADA, K.; KIRITA, T.; KONISHI, N. Loss of heterozygosity on chromosome 6q correlates with decreased thrombospondin-2expression in human salivary gland carcinomas. *Cancer Sci*, 94:530-535, 2003.
- KITAMURA, Y.; SHIMIZU, K.; TANAKA, S.; ITO, K.; EMI, M. Association of allelic loss on 1q, 4p, 7q, 9p, 9q, and 16q with postoperative death in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*, 6:1819-1825, 2000.
- KLINTENBERG, C.; OLOFSSON, J.; HELLQUIST, H.; Sokjer, H. Adenocarcinoma of the ethmoid sinuses: a review of 28 cases with special reference to dust exposure. *Cancer*, 54: 482- 488, 1984.
- KOMIYA, T.; PARK, Y.; MODI, S.; COXON, A.B.; OH, H.; KAYE, F.J. Sustained expression of Mect1-Maml2 is essential for tumor cell growth in salivary gland cancers carrying the t(11;19) translocation. *Oncogene*, 25:6128-6132, 2006.
- KOTWALL, C.A. Smoking as an etiologic factor in the development of Warthin's tumor of the parotid gland. *Am J Surg*, 164:646-647, 1992.
- KUNIMURA, T. Noninvasive carcinoma ex pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Otolaryngology- Head and Neck Surgery*, 137:687-688, 2007.

- LEE, J.H.; WELCH, D.R. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis. *Cancer Res*, 57:2384-2387, 1997.
- LEE, S.H.; STERLING, H.; BURLINGAME, A.; MCCORMICK, F. Tpr directly binds to Mad1 and Mad2 and is important for the Mad1-Mad2-mediated mitotic spindle checkpoint. *Genes Dev*, 22:2926-2931, 2008.
- LEWIS, J.E.; OLSEN, K.D.; SEBO, T.J. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: Pathologic analysis of 73 cases. *Hum Pathol*, 32:596-604, 2001.
- LI, Y.; ZHOU, Z.; ALIMANDI, M.; CHEN, C. WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets the full-length ErbB4 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer. *Oncogene*, 28:2948-2958, 2009.
- LIAO, H.; WINKFEIN, R. J.; MACK, G.; RATTNER, J. B.; YEN, T. J. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J. Cell Biol*, 130:507-518, 1995.
- LOEB, K.R.; LOEB, L.A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21:379-385, 2000.
- LOEB, L. A. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 61:3230-3239, 2001.
- LONGO, L.; BORGHINI, S.; SCHENA, F.; PARODI, S.; ALBINO, D.; BACHETTI, T.; DA PRATO, L.; TRUINI, M.; GAMBINI, C.; TONINI, G.P.; CECCHERINI, I.; PERRI, P. PHOX2A and PHOX2B genes are highly co-expressed in human neuroblastoma. *Int J Oncol*, 33:985-991, 2008.
- LOO, L.W.; GROVE, D.I.; WILLIAMS, E.M.; NEAL, C.L.; COUSENS, L.A.; SCHUBERT, E.L.; HOLCOMB, I.N.; MASSA, H.F.; GLOGOVAC, J.; LI, C.I.; MALONE, K.E.; DALING, J.R.; DELROW, J.J.; TRASK, B.J.; HSU, L.; PORTER, P.L. Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res*, 64:8541-8549, 2004.
- LOYOLA, A.M.; ARAÚJO, V.C.; SOUSA, S.O.M.; ARAÚJO, N.S. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a brazilian population. *Oral Oncol Eur J Cancer*, 31:197-201, 1995.
- LUNA, M.A.; EL-NAGGAR, A.; BATSAKIS, J.G.; WEBER, R.S.; GARNSEY, L.A.; GOEPFERT, H. Flow cytometric DNA content of adenoid cystic carcinoma of submandibular gland. Correlation of histologic features and prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 116:1291-1296, 1990.
- LUUKAA H.; KLEMI, P.; LEIVO, I.; KOIVUNEN, P.; LARANNE, J.; MAKITIE, A.; VIRTAMIENI, J.; HINKKA, S.; GRÉNMAN, R. Salivary gland cancer in Finland 1991-96: An evaluation of 237 cases. *Acta Otolaryngologica*, 125:207-214, 2005.
- MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850, 1995.
- MARK, H.F.; HANNA, I.; GNEPP, D.R. Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 82:187-192, 1996.
- MARK, J.; DAHLENFORS, R.; EKEDAHL, C.; STENMAN, G. The mixed salivary gland tumor: a normally benign human neoplasm frequently showing specific chromosomal abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet*, 2:231-241, 1980.
- MARK, J.; DAHLENFORS, R.; STENMAN, G.; NORDQUIST, A. Chromosomal patterns in Warthin's tumor. A second type of human benign salivary gland neoplasm. *Cancer Genet Cytogenet*, 46:35-39, 1990.
- MARTINS, C.; CAVACO, B.; TONON, G.; KAYE, F.J.; SOARES, J.; FONSECA, I. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn*, 6:205-210, 2004.
- MARTINS, C.; FONSECA, I.; ROQUE, L.; PEREIRA, T.; RIBEIRO, C.; BULLERDIEK, J.; SOARES, J.; PLAG1 gene alterations in salivary gland pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a combined study using chromosome banding, in situ hybridization and immunocytochemistry. *Journal Mod Pathol*, 18:1048-1055, 2005.
- MARTINS, C.; FONSECA, I.; ROQUE, L.; PINTO, A.E.; SOARES, J. Malignant salivary gland neoplasms: a cytogenetic study of 19 cases. *Eur J Cancer*. In: *Oral Oncol*, 128-132, 1996.
- MARTINS, C.; FONSECA, I.; ROQUE, L.; PINTO, A.E.; SOARES, J. Malignant

- salivary gland neoplasms: a cytogenetic study in 19 cases. *Eur J Cancer Part B Oral Oncol*, 32:128-132, 1997.
- MAURER, P.; T'SAS, F.; COUTTE, L.; CALLENS, N.; BRENNER, C.; VAN LINT, C.; DE LAUNOIT, Y.; BAERT, J.L. FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain. *Oncogene*, 22:3319-3329, 2003.
- MCGOWAN, P.M.; MCKIERNAN, E.; BOLSTER, F.; RYAN, B.M.; HILL, A.D.; MCDERMOTT, E.W.; EVOY, D.; O'HIGGINS, N.; CROWN, J.; DUFFY, M.J. ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Ann Oncol*, 19:1075-1081, 2008.
- METHENY-BARLOW, L.J.; LI, L.Y. The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. *Cell Res*, 13:3093-17, 2003.
- MIGITA, T.; RUIZ, S.; FORNARI, A.; FIORENTINO, M.; PRIOLO, C.; ZADRA, G.; INAZUKA, F.; GRISANZIO, C.; PALESCANDOLO, E.; SHIN, E.; FIORE, C.; XIE, W.; KUNG, A.L.; FEBBO, P.G.; SUBRAMANIAN, A.; MUCCI, L.; MA, J.; SIGNORETTI, S.; STAMPFER, M.; HAHN, W.C.; FINN, S.; LODA, M. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 101:519-532, 2009.
- MINN, A.J.; GUPTA, G.P.; SIEGEL, P.M.; BOS, P.D.; SHU, W.; GIRI, D.D.; VIALE, A.; OLSHEN, A.B.; GERALD, W.L.; MASSAGUE, J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436:518-54, 2005.
- MIRANDA, C.; ROCCATO, E.; RAHO, G.; PAGLIARDINI, S.; PIEROTTI, M.A.; GRECO, A. The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *J Cell Physiol*, 208:154-160, 2006.
- MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. (Eds.). *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer* (2009), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- MITRA, R.S.; ZHANG, Z.; HENSON, B.S.; KURNIT, D.M.; CAREY, T.E.; D'SILVA, N.J. Rap1A and rap1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. *Oncogene*, 22:6243-6256, 2003.
- MORIO, T.; MORIMITSU, Y.; HISAOKA, M.; MAKISHIMA, K.; HASHIMOTO, H. DNA copy number changes in carcinoma in pleomorphic adenoma of the salivary gland: a comparative genomic hybridization study. *Pathology International*, 52: 501-507, 2002.
- MORISHITA, D.; KATAYAMA, R.; SEKIMIZU, K.; TSURUO, T.; FUJITA, N. Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res*, 68:5076-5085, 2008.
- MOTOMURA, W.; TAKAHASHI, N.; NAGAMINE, M.; SAWAMUKAI, M.; TANNO, S.; KOHGO, Y. OKUMURA, T. Growth arrest by troglitazone is mediated by p27Kip1 accumulation, which results from dual inhibition of proteasome activity and Skp2 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*, 108:41-46, 2004.
- MULHERKAR, N.; PRASAD, K.V.; PRABHAKAR, B.S. MADD/DENN splice variant of the IG20 gene is a negative regulator of caspase-8 activation. Knockdown enhances TRAIL-induced apoptosis of cancer cells. *J Biol Chem*, 282:1715-1721, 2007.
- MURRAY, J.C.; SYMONDS, P.; WARD, W.; HUGGINS, M.; TIGA, A.; RICE, K.; HENG, Y.M.; TODD, I.; ROBINS, R.A. Colorectal cancer cells induce lymphocyte apoptosis by an endothelial monocyte-activating polypeptide-II-dependent mechanism. *J Immunol*, 1;172:274-281, 2004.
- NAGAO, K.; MATSUZAKI, O.; SAIGA, H.; SUGANO, I.; SHIGEMATSU, H.; KANEKO, T.; KATOH, T.; KITAMURA, T. Histopathologic studies on carcinoma in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer*, 48:113-121, 1981.
- NAKAJIMA, M.; FUKUCHI, M.; MIYAZAKI, T.; MASUDA, N.; KATO, H.; KUWANO, H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 88:1734-1739, 2003.
- NAKAMURA, M.; ISHIDA, E.; SHIMADA, K.; NAKASE, H.; SAKAKI, T.; KONISHI,

- N. Frequent HRK inactivation associated with low apoptotic index in secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 110:402-410, 2005.
- NAM, J.M.; ONODERA, Y.; MAZAKI, Y.; MIYOSHI, H.; HASHIMOTO, S.; SABE, H. CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J*, 26:647-656, 2007.
- NARKIEWICZ, J.; KLASA-MAZURKIEWICZ, D.; ZURAWA-JANICKA, D.; SKORKO-GLONEK, J.; EMERICH, J.; LIPINSKA, B. Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clin Biochem*, 41:561-569, 2008.
- NARLA, G.; HEATH, K.E.; REEVES, H.L.; LI, D.; GIONO, L.E.; KIMMELMAN, A.C.; GLUCKSMAN, M.J.; NARLA, J.; ENG, F.J.; CHAN, A.M.; FERRARI, A.C.; MARTIGNETTI, J.A.; FRIEDMAN, S.L. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science*, 294:2563-2566, 2001.
- NASSER, S.M.; FAQUIN, W.C.; DAYAL, Y. Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in gland salivary tumors: frequent expression of androgen in a subset of malignant salivary gland tumors. *Am J Clin Pathol*, 119:801-806, 2003.
- NATARAJAN, M.; STEWART, J.E.; GOLEMIS, E.A.; PUGACHEVA, E.N.; ALEXANDROPOULOS, K.; COX, B.D.; WANG, W.; GRAMMER, J.R.; LADSON C. L. FI/NEDD9/CAS-L is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene*, 25:1721-1732, 2006.
- NATSUGOE, S.; XIANGMING, C.; MATSUMOTO, M.; OKUMURA, H.; NAKASHIMA, S.; SAKITA, H.; ISHIGAMI, S.; BABA, M.; TAKAO, S.; AIKOU, T. Smad4 and transforming growth factor beta1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 8:1838-1842, 2002.
- NORDKVIST, A.; MARK, J.; GUSTAVSSON, H.; BANF, G.; STENMANN, G. Nonrandom chromosome rearrangements in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Genes Chromosomes Cancer*, 10:115-121, 1994.
- NORDKVIST, A.; RÖUER, E.; BANG, G.; GUSTAFSSON, H.; BEHRENDT, M.; RYD, W.; THORESEN, S.; DONATH, K.; STENMAN, G. expression and mutation patterns of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. *International J Oncol*, 16:477-483, 2000.
- NUCERA, C.; EECKHOUTE, J.; FINN, S.; CARROLL, J.S.; LIGON, A.H.; PRIOLO, C.; FADDA, G.; TONER, M.; SHEILS, O.; ATTARD, M.; PONTECORVI, A.; NOSE, V.; LODA, M.; BROWN, M. FOXA1 is a potential oncogene in anaplastic thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*, 15:3680-3689, 2009.
- O'BRIEN, C. J.; SOONG, S-J.; HERRERA, G. A.; URIST, M. M.; MADDOX, W. A. Malignant salivary tumors: Analysis of prognostic factors and survival. *Head Neck Surg*, 9:82-92, 1986.
- OBATA, T.; TOYOTA, M.; SATOH, A.; SASAKI, Y.; OGI, K.; AKINO, K.; SUZUKI, H.; MURAI, M.; KIKUCHI, T.; MITA, H.; ITOH, F.; ISSA, J.P.; TOKINO, T.; IMAI, K. Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 9:6410-6418, 2003.
- OH, Y.S.; EISELE, D.W. Salivary Glands Neoplasms. Em: Bailey BJ, Johnson JT, Newlands SD. *Head & Neck Surgery-Otolaryngology*, 4:1516-1533, 2006.
- OH, K.B.; STANTON, M.J.; WEST, W.W.; TODD, G.L.; WAGNER, K.U. Tsg101 is upregulated in a subset of invasive human breast cancers and its targeted overexpression in transgenic mice reveals weak oncogenic properties for mammary cancer initiation. *Oncogene*, 26:5950-5959, 2007.
- OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAU, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411:613-617, 2001.

- OKABE, M.; MIYABE, S.; NAGATSUKA, H.; TERADA, A.; HANAI, N.; YOKOI, M.; SHIMOZATO, K.; EIMOTO, T.; NAKAMURA, S.; NAGAI, N.; HASEGAWA, Y.; INAGAKI, H. MECT1-MAML2 Fusion Transcript Defines a Favorable Subset of Mucoepidermoid Carcinoma Mitsukuni. *Clin Cancer Res*, 12:13, 2006.
- OKAZAKI, N.; IKEDA, S.; OHARA, R.; SHIMADA, K.; YANAGAWA, T.; NAGASE, T.; OHARA, O.; KOGA, H. The novel protein complex with SMARCAD1/KIAA1122 binds to the vicinity of TSS. *J Mol Biol*, 382:257-265, 2008.
- OLSEN, K.D.; LEWIS, J.E. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review. *Head Neck*, 23:705-712, 2001.
- ONDER, T.; TIWARI, R.M.; VAN DER WAAL, I.; SNOW, G.B. Malignant adenolymphoma of the parotid gland: report of carcinomatous transformation. *J Laryngol Otol*, 104:656-661, 1990.
- O'NEILL, GM.; SEO, S.; SEREBRIISKII, I.G.; LESSIN, S.R.; GOLEMIS, E.A. A New Central Scaffold for Metastasis: Parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res*, 67:8975-8979, 2007.
- OSHIMA, T.; AKAIKE, M.; YOSHIHARA, K.; SHIOZAWA, M.; YAMAMOTO, N.; SATO, T.; AKIHITO, N.; NAGANO, Y.; FUJII, S.; KUNISAKI, C.; WADA, N.; RINO, Y.; TANAKA, K.; MASUDA, M.; IMADA, T. Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 33:573-577, 2008.
- OTHO, E.C.; JOHNSON, N.W.; OLASOJI, H.; DANFILLO, I.S.; ADELEKE, O.A. Salivary gland neoplasms in Maiduguri, north eastern Nigeria. *Oral Diseases*, 11:386-391, 2005.
- PALMER, R.M.; LUCAS, R.B.; KNIGHT, J.; GUSTERSON, B. Immunocytochemical identification of cell types in pleomorphic adenoma with particular reference to myoepithelial cells. *J Pathol*, 146:213-220, 1985.
- PARK, K.; KUECHLE, M.K.; CHOE, Y.; CRAIK, C.S.; LAWRENCE, O.T.; PRESLAND, R.B. Expression and characterization of constitutively active human caspase-14. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 347:941-948, 2006.
- PARMIGIANI, R.B.; BETTONI, F.; VIBRANOVSKI, M.D.; LOPES, M.H.; MARTINS, W.K.; CUNHA, I.W.; SOARES, F.A.; SIMPSON, A.J.; DE SOUZA, S.J.; CAMARGO, A.A. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:18066-18071, 2006.
- PASDER, O.; SHPUNGIN, S.; SALEM, Y.; MAKOVSKY, A.; VILCHICK, S.; MICHAELI, S.; MALOVANI, H.; NIR, U. Downregulation of Fer induces PPI activation and cell-cycle arrest in malignant cells. *Oncogene*, 25:4194-4206, 2006.
- PERSSON, F.; ANDRÉN, Y.; WINNES, M.; WEDELL, B.; NORDKVIST, A.; GUDNADOTTIR, G.; DAHLENFORS, R.; SJÖGREN, H.; MARK, J.; STENMAN G. High-resolution genomic profiling of adenomas and carcinomas of the salivary glands reveals amplification, rearrangement, and fusion of HMGA2. *Genes Chromosomes Cancer*, 48:69-82, 2009.
- PERSSON, F.; WINNES, M.; ANDRÉN, Y.; WEDELL, B.; DAHLENFORS, R.; ASP, J.; MARK, J.; ENLUND, F.; STENMAN, G. High-resolution array CGH analysis of salivary gland tumors reveals fusion and amplification of the FGFR1 and PLAG1 genes in ring chromosomes. *Oncogene*, 27:3072-3080, 2008.
- PETERSON, E.A.; KALIKIN, L.M.; STEELS, J.D.; ESTEY, M.P.; TRIMBLE, W.S.; PETTY, E.M. Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. *Mamm Genome*, 18:796-807, 2007.
- PINKSTON, J.A.; COLE, P. Cigarette smoking and Warthin's tumor. *Am J Epidemiol*, 144:183-187, 1996.
- PIPER, J.; RUTOVITZ, D.; SUDAR, D.; KALLIONIEMI, A.; WALDMAN, F.M.; GRAY, J.W.; PINKEL, D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19:10-26, 1995.
- PLESEC, T.P.; HUNT, J.L. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*, 16:196-203, 2009.
- PONCE-BRAVO, S.; LEDESMA-MONTES, C.; LÓPEZ-BECERRIL, U.; MORALES-

- SÁNCHEZ, I. Myoepithelial cells are the main component in pleomorphic adenomas? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12:110-115, 2007.
- PRAT, A.; PARERA, M.; REYES, V.; PERALTA, S.; CEDRÉS, S.; ANDREU, J.; HUGUET, P.; DEL CAMPO, J.M. Successful treatment of pulmonary metastatic salivary ductal carcinoma with trastuzumab-based therapy. *Head Neck*, 30:680-683, 2008.
- PRESS, M.F.; PIKE, M.C.; HUNG, G.; ZHOU, J.Y.; MA, Y.; GEORGE, J.; DIETZ-BAND, J.; JAMES, W.; SLAMON, D.J.; BATSAKIS, J.G.; EL-NAGGAR, A.K. Amplification and overexpression of Her2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res*, 54: 5675-5682, 1994.
- QUEIMADO, L.; LOPES, C.S.; REIS, A.M. WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 46:215-225, 2007.
- RAE, J.M.; JOHNSON, M.D.; CORDERO, K.E.; SCHEYS, J.O.; LARIOS, J.M.; GOTTARDIS, M.M.; PIENTA, K.J.; LIPPMAN, M.E. GREB1 is a novel androgen-regulated gene required for prostate cancer growth. *Prostate*, 66:886-894, 2006.
- RAHBAR, R.; GRIMMER, J.F.; VARGAS, S.O.; ROBSON, C.D.; MACK, J.W.; PEREZ-ATAYDE, A.R.; MARCUS, K.J.; GRIER, H.E.; HEALY, G.B.; MCGILL, T.J. Mucoepidermoid Carcinoma of the Parotid Gland in Children. *132:375-380*, 2006.
- RAO, P.H.; MURTY, V.V.V.S.; LOUIE, D.C.; CHAGANTI, R.S.K. Nonsystemic amplification of MYC with CDK4 and MDM2 in a malignant mixed tumor of salivary gland. *Cancer Genet Cytogenet*, 105:160-163, 1998.
- RAO, P.H.; ROBERTS, D.; ZHAO, Y.J.; BELL, D.; HARRIS, C.P.; WEBER, R.S.; EL-NAGGAR, A.K. Deletion of 1p32-p36 is the most frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Clin Cancer Res*, 14:5181-5187, 2008.
- REGEZI, J.A.; LLOYD, R.V.; ZARBO, R.J.; MCCLATCHEY, K.D. - Minor salivary gland tumors: a histologic and immunohistochemical study. *Cancer*, 55:108-115, 1985.
- REINACHER-SCHICK, A.; BALDUS, S.E.; ROMDHANA, B.; LANDSBERG, S.; ZAPATKA, M.; MÖNIG, S.P.; HÖLSCHER, A.H.; DIENES, H.P.; SCHMIEGEL, W.; SCHWARTE-WALDHOFF, I. Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas. *J Pathol*, 202: 412-420, 2004.
- REIS F.M.; LUISI, S.; CARNEIRO, M.M.; COBELLIS, L.; FEDERICO, M.; CAMARGOS, A.F.; PETRAGLIA, F. Activin, inhibin and the human breast. *Mol Cell Endocrinol*, 225:77-82, 2004.
- RIBATTI, D.; VACCA, A.; RUSNATI, M.; PRESTA, M. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18:327-334, 2007.
- RISINGER, J.I.; BERCHUCK, A.; KOHLER, M. F.; BOYD, J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature Genet*, 7:98-102, 1994.
- RØDAHL, E.; LYBAEK, H.; ARNES, J.; NESS, G.O. Chromosomal imbalances in some benign orbital tumours. *Acta Ophthalmol Scand*, 83:385-391, 2005.
- RODER, K.; KIM, K.H.; SUL, H.S. Induction of murine H-rev107 gene expression by growth arrest and histone acetylation: involvement of an Sp1/Sp3-binding GC-box. *Biochem Biophys Res Commun*, 294:63-70, 2002.
- ROGATTO, S.R.; RAINHO, C.A. Citogenética molecular. In: *Citogenética sem risco: biossegurança e garantia de qualidade*. Cap. 7, 1ª ed., FUNPEC, p.143, 2000.
- ROIJER, E.; NORDKVIST, A.; STROM, A.K.; RYD, W.; BEHRENDT, M.; BULLERDIEK, J.; MARK, J.; STENMAN, G. Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Am J Pathol*, 160:433-440, 2002.
- ROYCHOUDHURY, P.; CHAUDHURI, K. Evidence for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 97:574-575, 2007.

- RUEO, L.R.; ROSAI, S.; REMOTTI, D. Immunohistology of adenolymphoma (Warthin's tumor): evidence for a role of vascularization in the organization of the lymphoepithelial structure. *Histopathology*, 11:557-565, 1987.
- RUTHERFORD, S.; HAMPTON, G.M.; FRIERSON JR, H.F.; MOSKALUK, C.A. Mapping of candidate tumor suppressor genes on chromosome 12 in adenoid cystic carcinoma. *Laboratory Investigation*, 85:1076-1085, 2005.
- SAKABE, T.; SHINOMIYA, T.; MORI, T.; ARIYAMA, Y.; FUJIWARA, T.; NAKAMURA, Y.; INAZAWA, J. *Cancer Res*, 59:511-515, 1999.
- SANTOS, F. P. Hibridação Genômica comparativa de alta resolução em adenomas e adenocarcinomas de células basais. Tese de Doutorado, FOU SP, 2007.
- SANZ, C.; HORITA, M.; FERNANDEZ-LUNA, J.L. Fas signaling and blockade of Bcr-Abl kinase induce apoptotic Hrk protein via DREAM inhibition in human leukemia cells. *Haematologica*, 87:903-907, 2002.
- SARRAF, P.; MUELLER, E.; SMITH, W.M.; WRIGHT, H.M.; KUM, J.B.; AALTONEN, L.A.; DE LA CHAPELLE, A.; SPIEGELMAN, B.M.; ENG, C. Loss-of-function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. *Mol Cell*, 3:799-804, 1999.
- SATKO, I.; STANKO, P.; LONGAUEROVÁ, I. Salivary tumours in the stomatological clinics in Bratislava. *J Craniomaxillofac Surg*, 28: 56-61, 2000.
- SCHÉELE, S.; NYSTRÖM, A.; DURBEEJ, M.; TALTS, JF.; EKBLÖM, M.; EKBLÖM, P. Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med*, 85:825-836, 2007.
- SCHICK, B.; WEMMERT, S.; BECHTEL, U.; NICOLAI, P.; HOFMANN, T.; GOLABEK, W.; URBSCHAT S. Comprehensive genomic analysis identifies MDM2 and AURKA as novel amplified genes in juvenile angiofibromas. *Head & Neck*, 29:479-487, 2007.
- SCHOUMANS, J.; NIELSEN, K.; JEPPESEN, I.; ANDERLID, B.M.; BLENNOW, E.; BRONDUM-NIELSEN, K.; NORDENSKJOLD, M. A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined size. *Europ J Hum Genet*, 12:447-454, 2004.
- SCHREIBSTEIN, J. M.; TRONIC, B.; TARLOV, E.; HYBELS, R. L. Benign metastasizing pleomorphic adenoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 112:612-615, 1995.
- SCUDERI, R.; FAILLA, A. Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF): myth or reality? *Clin Ter*, 159:111-116, 2008.
- SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2:210-219, 2002.
- SEIFERT, G. World Health Organization international histological classification of tumours: Histological typing of salivary gland tumours. Berlin: Springer-Verlag, 1991.
- SEIFERT, G.; BULL, H.G.; DONATH, K. Histologic subclassification of the eystadenolymphoma of the parotid gland: analysis of 275 cases. *Virchows Arch (Pathol Anat)*, 388:13-38, 1980.
- SEIFERT, G.; HENNINGS, K.; CASELITZ, J. Metastatic tumors to the parotid and submandibular glands--analysis and differential diagnosis of 108 cases. *Pathol Res Pract*, 181:684-692, 1986.
- SEOANE, J. Escaping from the TGF β anti-proliferative control. Review. *Carcinogenesis*, 27:2148-2156, 2006.
- SESSIONS, R.B.; HARRISON, L.B.; FORASTIERE, A.A. Tumors of the salivary glands and paraganliomas. In: De Vita, V.T.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. *Cancer, principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 891, 2001.
- SHAN, Z.; PARKER, T.; WIEST, J.S. Identifying novel homozygous deletions by microsatellite analysis and characterization of tumor suppressor candidate 1 gene, TUSC1, on chromosome 9p in human lung cancer. *Oncogene*, 23:6612-6620, 2004.
- SHIMADA, K.; NAKAMURA, M.; ISHIDA, E.; KONISHI, N. Molecular roles of MAP kinases and FADD phosphorylation in prostate cancer. *Histol Histopathol*, 21:415-422, 2006.
- SEETHALA, R.R.; BARNES, E.L.; HUNT, J.L. Epithelial-Myoepithelial Carcinoma: A review of the clinicopathology spectrum and Immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the Salivary Glands and upper aerodigestive Tract., 31:44-57, 2007.

- SHIN, I.; KIM, S.; SONG, H.; KIM, H.R., MOON, A. H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem*, 280:14675-14683, 2005.
- SHIOTA, M.; IZUMI, H.; ONITSUKA, T.; MIYAMOTO, N.; KASHIWAGI, E.; KIDANI, A.; YOKOMIZO, A.; NAITO, S.; KOHNO, K. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res*, 68:98-105, 2008.
- SILVEIRA, A.C.; HURST, D.R.; VAIDYA, K.S.; AYER, D.E.; WELCH, D.R. Overexpression of the BRMS1 family member SUDS3 does not suppress metastasis of human cancer cells. *Cancer Lett*, 276:32-37, 2009.
- SMITH, A.J.; WALTERS, R.G.; FROGUEL, P.; BLAKEMORE, A.I. Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease. *Cytogenet Genome Res*, 123:17-26, 2008.
- SOBRINHO-SIMÕES, M.; MÁXIMO, V. Warthin's tumour. *Virchows Arch*, 448:877-878, 2006.
- SONG, X.; COFFA, S.; FU, H.; GUREVICH, V.V. How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J Biol Chem*, 284:685-695, 2009.
- SONG, Y.; ZHAO, C.; DONG, L.; FU, M.; XUE, L.; HUANG, Z.; TONG, T.; ZHOU, Z.; CHEN, A.; YANG, Z.; LU, N.; ZHAN, Q. Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 29:307-315, 2008.
- SPANDIDOS, D.A.; LAMOTHE, A.; FIELD, J.K. Multiple transcriptional activation of cellular oncogenes in human head and neck solid tumours. *Anticancer Res*, 5:221-419, 1985.
- SPIRO, R.H. Salivary neoplasm: Overview of a 35 years experience with 2807 patients. *Head Neck Surgery*, 8:177-184, 1986.
- SPIRO, R.H. Changing trends in the management of salivary tumors. *Semin Surg Oncol*, 11:240-245, 1995.
- SPIRO, R.H.; HUVOS, A.G.; BERK, R.; STRONG, E.W. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg*, 136:461-468, 1978.
- SPIRO, R.H.; HUVOS, A.G.; STRONG, E.W. Adenoid cystic carcinoma: factors influencing survival. *Am J Surg*, 138:579-583, 1979.
- SPIRO, R.H.; KOSS, L.G.; HADJU, S.I.; STRONG, E.W. Tumor of minor salivary origin. A clinicopathologic study 492 cases. *Cancer*, 31:117-129, 1973.
- STENMAN, G. Fusion oncogenes and tumor type specificity-insights from salivary gland tumors (Review). *Seminars in Cancer Biology* 15:224-235, 2005.
- STOECKLEIN, N.H.; ERBERSDOBLER, A.; SCHMIDT-KITTLER, O.; DIEBOLD, J.; SCHARDT, J.A.; IZBICKI, J.R.; KLEIN, C.A. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol*, 161:43-51, 2002.
- STOMEIO, F.; MELONI, F.; BOZZO, C.; FOIS, V.; PASTORE, A. Bilateral oncocytoma of the parotid gland. *Acta Otolaryngol*, 126:324-326, 2006.
- SU, K.; CHEN, F.; YAN, W.M.; ZENG, Q.L.; XU, L.; XI, D.; PI, B.; LUO, X.P.; NING, Q. Links Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin prothrombinase contributes to tumor hypercoagulability via IL-2 and IFN-gamma. *World J Gastroenterol*, 14:5980-5989, 2008.
- SUNAYAMA, J.; ANDO, Y.; ITOH, N.; TOMIYAMA, A.; SAKURADA, K.; SUGIYAMA, A.; KANG, D.; TASHIRO, F.; GOTOH, Y.; KUCHINO, Y.; KITANAKA, C. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. *Cell Death Differ*, 11:771-781, 2004.
- SUZUKI, N.; ONDA, T.; YAMAMOTO, N.; KATAKURA, A.; MIZOE, J.E.; SHIBAHARA, T. Mutation of the p16/CDKN2 gene and loss of heterozygosity in malignant mucosal melanoma and adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Int. J. Oncol*, 31:1061-1067, 2007.
- SYKES, A.J.; SLEVIN, N.J.; BIRZGALIS, A.R.; GUPTA, N.K. Submandibular gland carcinoma; An audit of local control and survival following adjuvant radiotherapy. *Oral Oncol*, 35:187-190, 1999.
- TAGAWA, H.; KARNAN, S.; KASUGAI, Y.; TUZUKI, S.; SUZUKI, R.; HOSOKAWA,

- Y.; SETO M. MASL1, a candidate oncogene found in amplification at 8p23.1, is translocated in immunoblastic B-cell lymphoma cell line OCI-LY8. *Oncogene*, 23:2576-2581, 2004.
- TAKAKURA, S.; OKAMOTO, A.; SAITO, M.; YASUHARA, T.; SHINOZAKI, H.; ISONISHI, S.; YOSHIMURA, T.; OHTAKE, Y.; OCHIALI, K.; TANAKA, T. Allelic imbalance in chromosome band 18q21 and SMAD4 mutations in ovarian cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, 24:264-271, 1999.
- TAKEBAYASHI, S.; HICKSON, A.; OGAWA, T.; JUNG, K.Y.; MINETA, H.; UEDA, Y.; GRENNAN, R.; FISHER, S.G.; CAREY, T.E. Loss of chromosome arm 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 41:145-154, 2004.
- TAKEL, K.; KOHNO, T.; HAMADA, K.; TAKITA, J.; NOGUCHI, M.; MATSUNO, Y.; HIROHASHI, S.; UEZATO, H.; YOKOTA, J. A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res*, 58:3700-3705, 1998.
- TANAKA, N.; FUKUZAWA, M. MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells. *Int J Oncol*, 33:815-821, 2008.
- TANIKAWA, C.; FURUKAWA, Y.; YOSHIDA, N.; ARAKAWA, H.; NAKAMURA, Y.; MATSUDA, K. XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene*, 28:3081-3092, 2009.
- TASKEN, K.; SOLBERG, R.; ZHAO, Y.; HANSSON, V.; JAHNSEN, T.; SICILIANO, M.J. The gene encoding the catalytic subunit C alpha of cAMP-dependent protein kinase (locus PRKACA) localizes to human chromosome region 19p13.1. *Genomics*, 15:535-538, 1996.
- TEE, Y.T.; CHEN, G.D.; LIN, L.Y.; KO, J.L.; WANG, P.H. Nm23-H1: a metastasis-associated gene. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 45:107-113, 2006.
- THIYAGARAJAN, S.; BHATIA, N.; REAGAN-SHAW, S.; COZMA, D.; THOMAS-TIKHONENKO, A.; AHMAD, N.; SPIEGELMAN, V.S. Role of GLI2 transcription factor in growth and tumorigenicity of prostate cells. *Cancer Res*, 67:10642-10646, 2007.
- TIRADO, Y.; WILLIAMS, M.D.; HANNA, E.Y.; KAYE, F.J. BATSAKIS, J.G.; EL-NAGGAR, A.K. CRTC1/MAML2 Fusion Transcript in High Grade Mucoepidermoid Carcinomas of Salivary and Thyroid Glands and Warthin's Tumors: Implications for Histogenesis and Biologic Behavior. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 46:708-715, 2007.
- TOIDA, M.; BALÁZS, M.; MORI, T.; ISHIMARU, J-I.; ICHIHARA, H.; FUJITSUKA, H.; HYDOO, I.; YOKOYAMA, K.; TATEMATSU, N.; ÁDÁNY, R.: Analysis of genetic alterations in salivary gland tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 127:34-37, 2001.
- TOIDA, M.; SHIMOKAWA, K.; MAKITA, H.; KATO, K.; KOBAYASHI, A.; KUSUNOKI, Y.; HATAKEYAMA, D.; FUJITSUKA, H.; YAMASHITA, T.; SHIBATA, T. Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 34:528-532, 2005.
- TONON, G.; MODI, S.; WU, L.; KUBO, A.; COXON, A.B.; KOMIYA, T.; O'NEIL, K.; STOVER, K.; EL-NAGGAR, A.; GRIFFIN, J.D.; KIRSCH, I.R.; KAYE, F.J. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet*, 33:208-213, 2003.
- TONON, G.; GEHLHAUS, K.S.; YONESCU, R.; KAYE, F.J.; KIRSCH, I.R. Multiple reciprocal translocations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 152:15-22, 2004.
- TSANG, Y.T.; CHANG, Y.M.; LU, X.; RAO, P.H.; LAU, C.C.; WONG, K.K. Amplification of MGC2177, PLAG1, PSMC6P, and LYN in a malignant mixed tumor of salivary gland detected by cDNA microarray with tyramide signal amplification. *Cancer Genet Cytogenet*, 152: 124-128, 2004.
- TU, H.; ZHOU, Z.; LIANG, Q.; LI, Z.; LI, D.; QING, J.; WANG, H.; ZHANG, L. CXCR4 and SDF-1 production are stimulated by hepatocyte growth factor and promote glioma cell invasion. *Onkologie*, 32:331-336, 2009.

- TYTOR, M.; GEMRYD, P.; WINGREN, S.; GRENKO, R.T.; LUNDGREN, J.; LUNDQUIST, P.G.; NORDENSKJÖLD, B. Heterogeneity of salivary gland tumors studied by flow cytometry. *Head Neck*, 15:514-521, 1993.
- URBAN, S.D.; HALL, J.M.; BENTKOVER, S.H.; KADISH, S.P. Salivary duct carcinoma of minor salivary gland origin: report of a case involving the cavernous sinus. *J Oral Maxillofac Surg*, 60:958-962, 2002.
- USENER, D.; SCHADENDORF, D.; KOCH, J.; DÜBEL, S.; EICHMÜLLER, S. cTAGE: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J Invest Dermatol*, 121:198-206, 2003.
- WANG, J.; DAY, R.; DONG, Y.; WEINTRAUB, S.J.; MICHEL, L. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers *Mol Cancer Ther*, 7:280-285, 2008.
- VAN AKEN, E.; DE WEVER, O.; CORREIA DA ROCHA, A.S.; MEREEL, M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch*, 439:725-751, 2001;
- VAN WEZEL, T.; LOMBAERTS, M.; VAN ROON, E.H.; PHILIPPO, K.; BAELDE, H. J.; SZUHAI, K.; CORNELISSE, C.J.; CLETON-JANSEN, A. M. Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. *Breast Cancer Res*, 7:998-1004, 2005.
- VARGAS, D.A.; TAKAHASHI, S.; RONAI, Z. Mdm2: A regulator of cell growth and death. *Adv Cancer Res.*, 89:1-34, 2003.
- VARGAS, P.A.; GERHARD, R.; ARAÚJO FILHO, V.J.F.; DE CASTRO, I.V. Salivary gland tumors in a brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clín Fac Med S. Paulo*, 57:271-276, 2002.
- VÉKONY, H.; RÖSER, K.; LÖNING, T.; YLSTRA, B.; MEIJER, G.A.; VAN WIERINGEN, W.N.; VAN DE WIEL, M.A.; CARVALHO, B.; KOK, K.; RENÉ LEEMANS, C.; VAN DER WAAL, I.; BLOEMENA, E. Copy number gain at 8q12.1-q22.1 is associated with a malignant tumor phenotype in salivary gland myoepitheliomas. *Genes Chromosomes & Cancer*, 48:202-212, 2009.
- VEKONY, H.; YLSTRA, B.; WILTING, S.M.; MEIJER, G.A.; VAN DE WIEL, M.A.; LEEMANS, C.R.; VAN DER WAAL, I.; BLOEMENA, E. DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13: 3133-3139, 2007.
- VERDORFER, I.; FEHR, A.; BULLERDIEK, J.; SCHOLZ, N.; BRUNNER, A.; KRUGMANN, J.; HAGER, M.; HAUFE, H.; MIKUZ, G.; SCHOLTZ, A. Chromosomal imbalances, 11q21 rearrangement and MECT1-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. *Oncol Rep*, 22:305-311, 2009.
- VERMA, R.S.; BABU, A. Human Chromosomes: Principles and Techniques. McGraw-Hill Inc, 8-14, 1995.
- VOZ, M.L.; AGTEN, N.S.; VAN DE VEN, W.J.; KAS, K. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res*, 60:106-113, 2000.
- VOZ, M.L.; ASTROM, A.K.; KAS, K.; MARK, J.; STENMAN, G.; VAN DE VEN, W.J. The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. *Oncogene*, 16:1409-1416, 1998.
- WAKEFIELD, L.; ROBINSON, J.; LONG, H.; IBBITT, J.C.; COOKE, S.; HURST, H.C.; SIM, E. Arylamine N-acetyltransferase 1 expression in breast cancer cell lines: a potential marker in estrogen receptor-positive tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 47:118-126, 2008.
- WALDRON, C.A. Mixed tumor (pleomorphic adenoma) and myoepithelioma. In Ellis, G.L.; Auclair, P.L.; Gneep, D.R. *Surgical pathology of the salivary glands*. USA: W. B. Sders Company, 10:165-186, 1991.
- WATSON, J.E.; DOGGETT, N.A.; ALBERTSON, D.G.; ANDAYA, A.; CHINNAIYAN, A.; VAN DEKKEN, H.; GINZINGER, D.; HAQQ, C.; JAMES, K.; KAMKAR, S.; KOWBEL, D.; PINKEL, D.; SCHMITT, L.; SIMKO, J.P.; VOLIK, S.; WEINBERG, V.K.; PARIS, P.L.; COLLINS, C. Integration of high-resolution array comparative genomic hybridization analysis of chromosome 16q

- with expression array data refines common regions of loss at 16q23-qter and identifies underlying candidate tumor suppressor genes in prostate cancer. *Oncogene*, 23:3487-3494, 2004.
- WEISS, M.M.; HERMSEN, M.A.J.A.; MEIJER, G.A.; van GRIEKEN, N.C.T.; BAAK, J.P. A.; KUIPERS, E.J.; van DIEST, P.J. Comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 52: 243-251, 1999.
- WILLMAN, C.L.; HROMAS, R.A. Genomic Alterations and Chromosomal Aberrations in Human Cancer. In: *Cancer Medicine*, 8:106-111, 2006.
- WONG, N.; WANG, K.F.; CHAN, J.K.C.; JOHNSON, P.J. *Hum Pathol*, 31, 771-774, 2000.
- WU, L.; LIU, J.; GAO, P.; NAKAMURA, M.; CAO, Y.; SHEN, H.; GRIFFIN, J.D. Transforming activity of MECT1-MAML2 fusion oncoprotein is mediated by constitutive CREB activation. *EMBO J*, 24:2391-2402, 2005.
- WÜLFING, C.; ELTZE, E.; PIECHOTA, H.; ABOL-ENEIN, H.; WÜLFING, P.; BODE, M.E.; HERTLE, L.; SIEVERT, K.D. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. *Oncol Rep*, 13:223-228, 2005.
- XIE, W.; BHARATHY, S.; KIM, D.; HAFFTY, B.G.; RIMM, D.L.; REISS, M. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncol Res*, 14:61-73, 2003.
- XIMENES-FILHO, J.A.; IMAMURA, R.; SENNES, L.U. Neoplasias benignas de glândulas salivares. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 6:202, 2002.
- XU, S.; FURUKAWA, T.; KANAI, N.; SUNAMURA, M.; HORII, A. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *J Hum Genet*, 50:159-167, 2005.
- XUE, H.; SITU, Z.Q.; WANG, C.J.; WU, J.Z. Overexpression and amplification of c-myc and c-Ha-ras oncogenes in pleomorphic salivary adenoma. *Chin Med J (Engl)*, 106:22-25, 1993.
- YAMADA, M.; TSUJI, N.; NAKAMURA, M.; MORIAI, R.; KOBAYASHI, D.; YAGIHASHI, A.; WATANABE, N. Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Res*, 22:3303-3307, 2002.
- YAMAMOTO, Y.; KISHIMOTO, Y.; VIRMANI, A.K.; SMITH, A.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J.; GAZDAR, A.F. Mutations associated with carcinomas arising from pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Hum Pathol*, 27:782-786, 1996a.
- YAMAMOTO, Y.; KISHIMOTO, Y.; WISTUBA, I.I.; VIRMANI, A.K.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J.; GAZDAR, A.F. DNA analysis at p53 locus in carcinomas arising from pleomorphic adenomas of salivary glands: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int*, 48: 265-272, 1998a.
- YAMAMOTO, Y.; VIRMANI, A.K.; WISTUBA, I.I.; MCINTIRE, D.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J.; GAZDAR, A.F. Loss of heterozygosity and microsatellite alterations in p53 and RB genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Hum Pathol*, 27:1204-1210, 1996b.
- YAMAMOTO, Y.; WISTUBA, I.I.; KISHIMOTO, Y.; VIRMANI, A.K.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J.; GAZDAR, A.F. DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int*, 48:273-280, 1998b.
- YILDIRIM, Y.; GUNEL, N.; COSKUN, U.; SANCAK, B.; BUKAN, N.; ASLAN, S.; CETIN, A. Serum big endothelin-1 levels in female patients with breast cancer. *Int Immunopharmacol*, 8:1119-1123, 2008.
- ZANTL, N.; WEIRICH, G.; ZALL, H.; SEIFFERT, B.M.; FISCHER, S.F.; KIRSCHNEK, S.; HARTMANN, C.; FRITSCH, R.M.; GILLISSEN, B.; DANIEL, P.T.; HÄCKER, G. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*, 26:7038-7048, 2007.
- ZHANG, S.H.; XU, A.M.; CHEN, X.F.; LI, D.H.; SUN, M.P.; WANG, Y.J. Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, 39:1827-1834, 2008.

- ZARKA, M.A. Epithelioid Cell Clusters With an Extensive Lymphoid Background: A Common Cytologic Architectural Pattern in the Diagnosis of Salivary Gland Lesions by Fine-Needle Aspiration Biopsy. *Arch Pathol Lab Med*, 131:424-433, 2007.
- ZHAO, H.; ZHANG, J.; LU, J.; HE, X.; CHEN, C.; LI, X.; GONG, L.; BAO, G.; FU, Q.; CHEN, S.; LIN, W.; SHI, H.; MA, J.; LIU, X.; MA, Q.; YAO, L. Reduced expression of N-Myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer. *BMC Cancer*, 8:303, 2008.
- ZHANG, L.H.; QIN, L.X.; MA, Z.C.; YE, S.L.; LIU, Y.K.; YE, Q.H.; WU, X.; HUANG, W.; TANG, Z.Y. Allelic imbalance regions on chromosomes 8p, 17p and 19p related to metastasis of hepatocellular carcinoma: comparison between matched primary and metastatic lesions in 22 patients by genome-wide microsatellite analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129:279-86, 2003.
- ZHANG, Y.; PU, X.; SHI, M.; CHEN, L.; QIAN, L.; SONG, Y.; YUAN, G.; ZHANG, H.; YU, M.; HU, M.; SHEN, B.; GUO, N. c-Jun, a crucial molecule in metastasis of breast cancer and potential target for biotherapy. *Oncol Rep*, 18:1207-1212, 2007.
- ZHENG, M.; SIMON, R.; MIRLACHER, M.; MAURER, R.; GASSER, T.; FORSTER, T.; DIENER, P.A.; MIHATSCH, M.J. SAUTER, G.; SCHRAML, P. TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Am J Pathol*, 165:63-69, 2004.
- ZHOU, D.; CHEN, B.; YE, J.J.; CHEN, S. A novel crosstalk mechanism between nuclear receptor-mediated and growth factor/Ras-mediated pathways through PNRG-Grb2 interaction. *Oncogene*, 23:5394-5404, 2004.
- ZHU, M.; WANG, F.; YAN, F.; YAO, P.Y.; DU, J.; GAO, X.; WANG, X.; WU, Q.; WARD, T.; LI, J.; KIOKO, S.; HU, R.; XIE, W.; DING, X.; YAO, X. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J Biol Chem*, 283:18916-18925, 2008.



Anexos

ANEXO 1. Informações clínico-patológicas dos pacientes com tumores de glândula salivar avaliados por CGH de alta resolução.

AMOSTRAS PARAFINADAS													
AMOSTRAS FIXADAS E EM BLOCOS DE PARAFINA													
Caso	Idade	Sexo	Consumo de cigarro	Consumo de álcool	Local do tumor	Data da cirurgia	Tipo de cirurgia	Comprometi/o de linfonodos	Tamanho do tumor (cm)	Recidiva	2º tumor primário	Follow up	Data do último retorno
AP15	51	F	-	-	PAROT	28/07/1995	PPCF	-	2.8	-	-	VSD	29/01/2007
AP16	76	F	-	Ex (+)	PALDM	27/07/1995	RCLMD	-	2.0	-	-	SCP	18/05/1999
AP17	28	M	-	-	PAROT	29/05/1995	PPCF	-	6.0	-	-	VSD	27/05/2008
AP18	52	M	-	-	PAROT	09/02/1996	PTCF	-	2.0	+	+	MCC	10/05/1998
AP19	54	F	-	-	PAROT	19/01/1998	PPCF	-	1.3	-	+	VSD	18/04/2008
AP28	16	F	+	-	PAROT	26/02/1973	PPCF	-	4.5	-	-	SCP	01/03/1973
AP29	39	F	+	+	PAROT	04/07/1995	PPCF	-	2.5	-	-	SCP	17/07/1996
AP34	17	F	-	-	PAROT	30/09/1994	PPCF	-	3.0	-	-	SCP	23/08/2006
AP37	12	F	-	-	SUBMAN	16/09/1997	SML	+	1.5	-	-	VSD	20/02/2008
AP39	56	F	Ex (+)	-	PAROT	09/10/2002	PPCF	-	0.7	-	+	SCP	18/07/2006
AP40	33	F	+	-	PAROT	05/08/2002	PPCF	-	4.5	-	-	SCP	06/01/2004
AP41	31	F	-	+	PAROT	23/08/2002	PPCF	-	2.5	-	-	VSD	05/03/2007
AP43	41	M	Ex (+)	-	SUBMAN	29/02/2001	SML	-	4.5	-	-	SCP	08/10/2002
AP45	44	M	+	-	PAROT	26/07/2002	PPCF	-	1.2	-	-	SCP	12/02/2004
AP46	32	F	-	-	PAROT	29/05/2002	PPCF	-	4.5	-	-	SCP	21/05/2005
AP47	37	F	+	-	GLSMIO	02/09/2002	PPCF	-	8.0	-	-	SCP	25/07/2006
AP49	23	F	Ex (+)	-	PAROT	25/03/1986	PPCF	-	2.0	+	+	VSD	21/05/2008
AP50	12	F	-	-	PAROT	02/08/1989	PPCF	-	4.5	+	-	SCP	03/11/2005
AP51	38	F	-	-	PAROT	27/08/1987	PPCF	-	1.0	-	-	SCP	01/11/1990
AP53	38	F	-	-	PAROT	27/08/1987	PPCF	-	1.0	-	-	SCP	01/11/1990
AP54	45	M	-	-	PAROT	26/02/2003	PPCF	-	1.5	-	-	VSD	19/11/2007
AP55	29	F	+	-	PAROT	24/02/1986	PPCF	-	2.0	+	-	SCP	04/10/2005
CAC1	42	M	-	+	PAROT	24/11/2004	PTCF	+	3.0	+	-	SCP	10/11/2006
CDS2	78	F	-	-	PAROT	30/08/1978	PPCF	+	2.3	-	-	SCP	22/07/1992

CDS3	60	M	-	-	PAROT	02/07/1990	PTCF	+	3.0	-	-	MCC	05/01/1991
CDS5	58	M	ND	ND	PAROT	22/04/1987	PPCF	+	3.5	ND	ND	ND	ND
CEM1	36	F	-	-	PAROT	05/08/1963	PPCF	-	2.7	-	-	VSD	08/08/2007
CEM2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CXAP1	22	F	+	+	SUBMAN	29/09/2001	ESA	+	3.5	-	-	VSD	19/08/2008
CXAP2	36	F	ND	ND	PAROT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VSD	ND
CXAP3	66	M	ND	ND	PAROT	01/01/1996	ND	+	6.0	+	ND	SCP	01/07/1997
CXAP4	50	F	ND	ND	PAROT	ND	ND	ND	8.4	ND	ND	VSD	ND
CXAP5	45	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.5	ND	ND	ND	ND
CXAP6	55	F	ND	ND	PAROT	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
ON1	75	M	-	-	PAROT	23/12/1994	PPCF	-	1.7	-	+	SCP	17/06/2002
ON2	57	F	ND	ND	PAROT	03/03/1989	PPCF	-	4.5	-	+	SCP	22/04/1996
TW5	68	M	+	+	PAROT	17/12/1985	PPCF	+	4.0	-	-	MOC	25/06/2003
TW8	45	F	+	+	PAROT	21/08/2002	PPCF	-	1.2	-	-	VSD	05/11/2007
TW10	56	M	+	+	PAROT	24/09/2002	PPCF	-	1.8	-	-	VSD	30/10/2007
TW12	57	M	+	+	PAROT	30/01/2002	PPCF	-	2.0	-	-	VSC	10/12/2007
TW13	68	M	-	-	PAROT	12/03/2002	PPCF	-	3.5	-	+	VCD	25/04/2008
TW14	71	M	+	+	PAROT	05/01/1999	PPCF	-	2.5	-	-	SCP	02/08/1999
TW15	61	F	+	+	PAROT	26/01/1999	PPCF	-	3.5	-	-	VSD	09/01/2008
TW16	55	F	+	+	PAROT	05/01/1999	PPCF	-	6.2	-	-	SCP	02/07/2001
TW17	36	M	+	+	PAROT	29/06/1999	PPCF	-	2.7	+	+	VSD	09/04/2008
TW18	50	M	+	+	PAROT	04/02/1999	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	05/04/2000
TW19	61	M	+	+	PAROT	27/11/2002	PPCF	-	1.3	-	+	SCP	03/12/2002
AMOSTRAS À FRESCO													
Caso	Idade	Sexo	Consumo de cigarro	Consumo de álcool	Local do tumor	Data da cirurgia	Tipo de cirurgia	Comprometi/o de linfonodos	Tamanho do tumor (cm)	Recidiva	2º tumor primário	Follow up	Data do último retorno
ACAR1F	39	M	-	+	PAROT	08/05/2003	PPCF	-	2.0	-	-	VSD	08/08/2008
ACAR2F	68	F	-	+	PAROT	01/10/2003	PPCF	-	5.0	-	-	VSD	01/02/2007
ACAR3F	25	F	-	-	PAROT	17/10/2003	PPCF	-	1.8	-	-	VSD	08/05/2008
AP2F	2	M	-	-	SUBMAN	23/04/2004	SML	-	2.0	-	-	SCP	05/07/2004

AP5F	19	M	-	+	SUBMAN	17/02/2004	PPCF	-	3.5	-	-	VSD	20/02/2008
AP7F	40	F	Ex (+)	-	SUBMAN	07/01/2004	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	16/09/2005
AP8F	64	M	+	+	ND	28/01/2004	ND	-	3.2	+	-	VSD	27/03/2008
AP9F	25	M	-	+	SUBMAN	12/01/2004	PPCF	-	2.6	-	-	VSD	29/04/2008
CAC1F	44	F	+	+	PAROT	24/10/2001	PPCF	-	ND	+	-	MCC	07/07/2008
CAC2F	33	F	+	+	PAROT	12/12/2000	PTCF	-	3.5	+	-	MOC	29/09/2003
CAC3F	24	F	-	-	GLSMEO	20/09/2002	PPCF	-	1.5	-	-	VSD	02/04/2007
CAC4F	65	F	-	-	GLSMEO	05/05/2004	GST	+	3.0	-	-	MCC	04/08/2007
CAC5F	43	M	Ex (+)	-	GLSMIO	18/10/2002	PPCF	-	1.0	+	-	VCD	15/09/2008
CME1F	44	M	-	+	SUBMAN	04/08/2004	RCLMD	-	1.6	-	-	VSD	08/08/2008
CME2F	62	F	-	-	PAROT	14/09/2002	PPCF	-	1.6	-	-	VSD	01/02/2007
CME4F	81	F	-	-	SUBLING	14/09/2004	PPCF	-	4.3	-	-	VSD	08/05/2008
CME5F	28	M	+	-	PAROT	30/05/2003	PPCF	-	1.5	-	-	VSD	08/08/2008

(+) Sim; (-) Não; Ex (+) Ex-consumista; (F) Feminino; (M) Masculino; (PAROT) Parótida; (PALDM) Palato Duro e/ou Mole; (SUBMAN) Submandibular; (GLSMIO) Glândulas Salivares Menores Intra-Orais; (GLSMEO) Glândulas Salivares Menores Extra-Orais; (SUBLING) Sublingual; (PPCF) Parotidectomia Parcial com Conservação do nervo Facial; (PTCF) Parotidectomia Total com Conservação do nervo Facial; (RCLMD) Ressecção em Cunha LMD; (SML) Submaxilectomia; (GST) Glossectomia; (ESA) Esvaziamento Supra-omo-hiideo Ampliado; (VSD) Vivo Sem a Doença; (VCD) Vivo Com a Doença; (MCC) Morte por Câncer; (MOC) Morte por Outras Causas; (SCP) Seguimento Clínico Perdido; (ND) Não Determinado.

ANEXO 2. Informações clínico-patológicas dos casos de adenomas pleomórficos (AP), a fresco, selecionados para a avaliação da expressão dos transcritos.

ADENOMAS PLEOMÓRFICOS													
Caso	Idade	Sexo	Consumo de cigarro	Consumo de álcool	Local do tumor	Data da cirurgia	Tipo de cirurgia	Comprometi/o de linfonodos	Tamanho do tumor (cm)	Recidiva	2º tumor primário	Follow up	Data do último retorno
2 T	67	F	-	+	PAROT	10/01/2002	PPCF	-	3.5	-	-	SCP	30/12/2005
3 T	28	F	-	-	PAROT	29/08/2001	PTCF	-	2.0	-	-	SCP	13/10/2003
5 T	48	F	-	-	PAROT	05/02/2002	PPCF	-	6.0	-	+	VSD	03/07/2008
7 T	27	F	-	-	PAROT	29/05/2002	PTCF	-	1.1	-	-	VSD	08/01/2008
10 T	56	F	-	-	PAROT	01/08/2003	PPCF	-	2.0	-	-	VSD	08/02/2007
12 T	43	F	-	+	PAROT	25/06/2002	PPCF	-	2.8	-	-	SCP	14/01/2003
14 T	33	F	+	-	PAROT	05/08/2002	PPCF	-	4.5	-	-	SCP	06/01/2004
17 T	31	F	-	+	PAROT	23/08/2002	PPCF	-	2.5	-	-	VSD	05/03/2007
18 T	50	M	-	+	PAROT	05/10/2002	PPCF	-	5.5	-	+	VSD	01/10/2008
19 T	29	F	-	-	PAROT	20/03/2003	PPCF	-	3.0	-	-	VSD	09/01/2008
20 T	84	F	-	-	PAROT	23/04/2003	PPCF	-	2.3	-	-	VSD	15/09/2008
21 T	67	F	-	-	PAROT	26/05/2003	PPCF	-	4.0	-	-	SCP	04/06/2004
24 T	28	F	+	+	PAROT	26/05/2003	PPCF	-	4.8	-	-	SCP	14/07/2003
27 T	60	F	-	-	PAROT	16/10/2000	PPCF	-	1.2	-	-	VSD	09/09/2008
28 T	41	M	-	+	PAROT	28/10/2003	PPCF	-	1.5	-	-	VSD	19/09/2008
31 T	25	F	-	-	PAROT	14/09/2001	PPCF	-	4.0	-	-	VSD	10/05/2007
32 T	72	M	+	Ex (+)	PAROT	31/03/2004	PPCF	-	3.0	-	-	SCP	24/04/2004
36 T	71	F	-	-	PAROT	16/02/2005	PTCF	-	6.0	-	-	VSD	03/06/2008
38 T	27	M	-	-	PAROT	27/04/2005	PPCF	-	3.8	-	-	SCP	08/11/2005
39 T	47	F	-	Ex (+)	PAROT	11/05/2005	PTCF	-	1.4	-	-	VSD	12/02/2008
40 T	61	F	-	-	PAROT	25/05/2005	PPCF	-	7.0	-	-	SCP	30/11/2006
41 T	60	F	+	-	PAROT	23/09/2005	PTCF	-	2.1	-	-	VSD	20/12/2007
42 T	61	M	-	-	PAROT	26/10/2005	PPCF	-	1.7	-	-	VSD	12/02/2007
44 T	68	F	+	-	PAROT	10/05/2006	PPCF	-	1.5	-	-	VSD	05/05/2008
46 T	41	M	+	-	PAROT	12/06/2006	PPCF	-	2.0	-	-	VSD	09/08/2007
47 T	51	F	-	+	PAROT	21/06/2006	PPCF	-	2.7	-	-	SCP	13/07/2006

50 T	26	M	-	-	PAROT	21/09/2006	PTCF	-	2.0	-	-	VSD	25/07/2008
53 T	55	F	ND	ND	PAROT	23/07/2007	PPCF	-	1.5	-	-	VSD	25/07/2007
54 T	46	M	+	-	PAROT	15/01/2008	PPCF	-	1.4	-	-	VSD	24/01/2008
AP 3F	36	F	Ex (+)	-	SUBMAND	06/03/2003	PPCF	-	1.8	-	-	SCP	23/06/2006
AP 4F	36	M	-	-	GLSMIO	29/08/2002	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	17/12/2002
AP 5F	19	M	-	+	SUBMAN	17/02/2004	PPCF	-	3.5	-	-	VSD	20/02/2008
AP 6F	34	M	-	+	SUBMAN	16/01/2004	PPCF	-	3.7	-	-	VSD	14/03/2008
AP 7F	40	F	Ex (+)	-	SUBMAN	07/01/2004	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	16/09/2005
AP 8F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AP 9F	25	M	-	+	SUBMAN	12/01/2004	PPCF	-	2.6	-	-	VSD	29/04/2008
AP10F	19	F	-	-	PAROT	24/03/2002	PPCF	-	3.4	-	-	SCP	17/07/2002

(+) Sim; (-) Não; Ex (+) Ex-consumista; (F) Feminino; (M) Masculino; (PPCF) Parotidectomia Parcial com Conservação do nervo Facial; (PTCF) Parotidectomia Total com Conservação do nervo Facial; (SML) Submaxilectomia; (VSD) Vivo Sem a Doença; (VCD) Vivo Com a Doença; (MCC) Morte por Câncer; (MOC) Morte por Outras Causas; (SCP) Seguimento Clínico Perdido; (ND) Não Determinado.

ANEXO 3. Informações clínico-patológicas dos casos de tumores de Warthin (TW), fixados em formalina e em blocos de parafina (FFEP), selecionados para a avaliação da expressão das proteínas HRK e E-caderina.

TUMORES DE WARTHIN													
Caso	Idade	Sexo	Consumo de cigarro	Consumo de álcool	Local do tumor	Data da cirurgia	Tipo de cirurgia	Comprometi/o de linfonodos	Tamanho do tumor (cm)	Recidiva	2º tumor primário	Follow up	Data do último retorno
1	45	F	+	-	PAROT	18/10/2000	PPCF	-	1.8	-	-	SCP	16/08/2001
2	68	M	+	+	PAROT	17/12/1985	PPCF	+	4.0	-	-	MOC	25/06/2003
3	68	M	-	-	PAROT	06/05/1991	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	07/04/1992
4	55	F	+	+	PAROT	05/01/1999	PPCF	-	6.2	-	-	SCP	02/07/2001
5	71	M	+	+	PAROT	05/01/1999	PPCF	-	2.5	-	-	SCP	02/08/1999
6	61	F	+	+	PAROT	26/01/1999	PPCF	-	3.5	-	-	VSD	09/01/2008
7	50	M	+	+	PAROT	04/02/1999	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	05/04/2000
8	79	F	-	-	PAROT	11/04/2001	PPCF	-	2.5	-	-	SCP	23/11/2004
9	50	M	+	+	PAROT	27/06/2000	PPCF	-	5.0	-	-	SCP	04/12/2001
10	64	F	+	+	PAROT	06/07/2001	PPCF	-	1.7	-	+	VSD	14/04/2008
11	56	M	+	+	PAROT	24/09/2002	PPCF	-	1.8	-	-	VSD	30/10/2007
12	68	M	-	-	PAROT	12/03/2002	PPCF	-	3.5	-	+	VCD	22/11/2008
13	45	F	+	+	PAROT	21/08/2002	PPCF	-	1.2	-	-	VSD	05/11/2007
14	61	M	+	+	PAROT	27/11/2002	PPCF	-	1.3	-	+	SCP	03/12/2002
15	57	M	+	-	PAROT	30/01/2002	PPCF	-	2.0	-	-	VSD	10/12/2007
16	58	M	+	+	PAROT	01/02/2002	PPCF	-	2.5	-	-	VSD	02/05/2007
17	65	M	Ex (+)	+	PAROT	11/05/2005	PPCF	-	1.4	-	-	SCP	22/05/2006
18	62	M	+	+	PAROT	27/06/2005	PPCF	-	6.0	-	-	VSD	26/04/2007
19	51	M	+	+	PAROT	08/10/2005	PPCF	-	3.0	-	-	VSD	02/04/2007
20	42	M	+	+	PAROT	13/10/2005	PTCF	-	3.0	-	-	VSD	01/08/2008
21	66	M	+	+	PAROT	09/05/2006	PPCF	-	1.0	-	+	VSD	27/10/2008
22	72	F	-	-	PAROT	12/03/2007	PPCF	-	3.5	-	-	VSD	05/11/2008
23	36	M	+	+	PAROT	29/06/1999	PPCF	-	2.7	+	+	VSD	09/04/2008
24	76	M	+	+	PAROT	07/04/1982	PPCF	-	4.0	-	-	SCP	23/04/1982
25	39	F	+	+	PAROT	29/11/1982	PPCF	-	6.0	-	-	SCP	20/05/1983
26	80	M	-	-	PAROT	11/05/1983	PPCF	-	2.5	-	-	SCP	11/05/1983

27	58	M	+	-	PAROT	07/08/1984	PPCF	-	2.0	+	-	SCP	14/08/2003
28	60	M	ND	ND	PAROT	27/09/1984	PPCF	-	6.0	-	-	SCP	29/09/1985
29	56	F	+	-	PAROT	18/01/1985	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	10/03/1987
30	77	M	-	-	PAROT	22/09/1989	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	31/01/1994
31	71	M	+	+	PAROT	04/12/1989	PPCF	-	3.0	+	-	SCP	28/04/2003
32	73	M	ND	ND	SUBMAND	25/05/1990	CST	-	3.8	-	-	MOC	15/10/1999
33	46	M	+	-	PAROT	22/10/1990	PTCF	-	1.8	+	-	MOC	18/08/2001
34	65	M	ND	ND	PAROT	17/06/1987	PPCF	-	1.5	-	-	SCP	26/06/1987
35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	68	F	-	-	ND	14/09/1988	PPCF	-	4.3	-	-	SCP	13/05/1991
37	68	M	ND	ND	PAROT	22/06/1989	PPCF	-	3.8	-	+	MOC	10/07/1989
38	69	F	ND	ND	PAROT	24/10/1989	PPCF	-	7.0	-	+	MOC	21/01/1993
39	75	F	+	-	PAROT	04/07/1986	CE+DA	-	3.0	-	-	SCP	09/10/1986
40	62	M	ND	ND	PAROT	14/07/1986	PPCF	-	1.3	-	-	SCP	06/06/1991
41	51	M	+	Ex (+)	PAROT	15/08/1986	PPCF	-	2.5	-	-	SCP	04/04/2002
42	53	M	+	+	PAROT	15/08/1986	PPCF	-	2.5	-	+	SCP	03/02/1999
43	56	M	ND	ND	PAROT	05/11/1990	PPCF	-	4.5	-	-	SCP	07/11/1990
44	57	M	+	+	PAROT	14/02/1991	PPCF	-	7.0	-	+	SCP	27/03/1996
45	48	F	ND	-	PAROT	28/05/1991	PPCF	-	1.4	-	-	SCP	06/08/1992
46	58	F	+	-	PAROT	12/09/1997	PPCF	-	6.9	-	-	SCP	20/08/2001
47	70	F	+	+	PAROT	14/11/1997	PPCF	-	1.0	-	-	SCP	24/08/2000

(+) Sim; (-) Não; Ex (+) Ex-consumista; (F) Feminino; (M) Masculino; (PPCF) Parotidectomia Parcial com Conservação do nervo Facial; (PTCF) Parotidectomia Total com Conservação do nervo Facial; (CST) Cervicotomia Submandibular Transversal; (CE+DA) Cervicotomia exploradora + Drenagem de Abscesso; (VSD) Vivo Sem a Doença; (VCD) Vivo Com a Doença; (MCC) Morte por Câncer; (MOC) Morte por Outras Causas; (SCP) Seguimento Clínico Perdido; (ND) Não Determinado.

ANEXO 4. Regiões mínimas comuns envolvidas em alterações genômicas (ganhos e perdas de DNA) identificadas pela HR-CGH ($p < 0,05$) em cada uma das 49 amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina dos TGS avaliados neste estudo.

CASOS	PERDAS	GANHOS
AP		
AP15	1p22; 1p31; 2p13-p22; 2q24-q32; 2q32-q34; 3p21; 3p22-p23; 3q13.1; 3q24-q26.1; 4q28; 4q31.5-q32; 5p13-p14; 5p14; 5q21-q31; 5q32-q34; 6p21.3-p22; 6q12; 6q16; 6q24; 7p14-p15; 7q11.2; 7q31-q33; 9p13-p23; 9q22-q31; 10q24-q25; 12q14-q24.1; 13q22-q31; 15q21; 18q21; 20q12; 22q11.2; Xq12-q13; Xq22-q24	1p35-p36.3; 1q21; 1q22-q23; 1q42-q44; 2p25; 2q21-q22; 2q36-q37; 3p24-p25; 3q22; 3q27-q29; 4p16; 4q24; 5p15.2-p15.3; 6p24-p25; 7p21-p22; 8p11.2; 8p12; 8p22-p23; 9p23-p24; 9q13-q21; 9q34; 10q22; 10q26; 11p11.2-p12; 11p15; 11q23-q25; 12p11.2; 12p13; 12q24.3; 13q12-q14; 13q32-q34; 14q32; 15q11.2-q15; 15q25-q26; 16p11.2-p12; 16p12-p13.3; 17p11.2-p13; 17q22-q25; 18p11.2; 18p11.3; 18q11.2-q12; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p12-p13; 20q13.3; 21q22; Xp11.4-p22.3; Xq28; Yp11.2-p11.3
AP16	1p12-p21; 1p22; 1p31-p35; 1q21; 1q23-q25; 1q31-q44; 2p11.2-p13; 2p16-p25; 2q34-q37; 3p12-p14; 3p21-p25; 3q13.3-q22; 3q26.1; 3q29; 4p12-p16; 4q13-q22; 4q28-q35; 5p12-p15.3; 5q11.2; 5q12-q14; 5q31-q35; 6p12-p21.3; 6p22; 6q12; 6q14-q22; 6q24-q25; 6q26-q27; 7p11.2-p21; 7p21-p22; 7q21-q36; 8p11.2; 8p12-p23; 8q12-q13; 8q21.1-q21.3; 8q23; 8q24.1-q24.3; 9p12-p13; 9p13-p23; 10p11.2-p12; 10p13-p15; 10q11.2-q26; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q12-q24.3; 13q12-q21; 13q21-q34; 14q11.2-q13; 14q21-q32; 15q21; 15q24-q26; 15q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17p13; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12; 18q21; 18q22-q23; 19p13.2-p13.3; 19q13.1-q13.2; 20p11.2-p13; 20q11.2; 20q12-q13.2; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2; Xp11.4-p21; Xq12-q21; Xq21-q28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2	2q14.3; 4q12-q13; 4q27-q28; 5q14-q15; 6q22-q23; 11p13-p14; 11q12; 11q14-q21; 19q13.4
AP17	1p13-p32; 1q21; 1q23-q32; 1q32-q41; 2p11.2-p21; 2q11.2-q33; 3p12-p21; 3q12-q26.3; 3q27-q28; 4p12-p14; 4q21-q24; 4q26-q32; 5q15-q21; 5q23-q31; 6p12-p21.1; 6p21.3-p23; 6q12-q14; 6q24; 7p13-p21; 7q33-q36; 8p11.2-p12; 8q11.2-q22; 9p13-p23; 9q21-q22; 9q31-q34; 10p11.2; 10q11.2-q22; 10q25-q26; 11p12-p14; 11q12-q14; 11q23; 11q24-q25; 12p11.2-p13; 12q12-q24.3; 13q21-q31; 14q11.2-q21; 14q24-q32; 15q15-q21; 15q24-q25; 16p12-p13.3; 16q12.2-q13; 16q22-q24; 17q25; 18p11.2; 18q21-q22; 19q13.1-q13.2; 20p12-p13; 22q13; Xq21; Xq21-q27	1p13; 1p36.1-p36.2; 3p21; 3p25; 4p16; 5q12-q13; 5q23; 5q33-q34; 5q35; 6q16; 6q21-q22; 6q26-q27; 7p11.2; 7q11.2; 7q22-q31; 8p21-p22; 8p23; 11p15; 14q22-q23; 14q24; 15q26; 17p11.2-p12; 17p12-p13; 18q12; 20q12-q13.1; 21q11.2-q21; 21q22; 22q13; Xp11.2-p21; Xq27-q28; Yq11.2
AP18	1p31-p36.3; 2p13-p15; 2p16-p22; 2p22-p23; 2p23-p25; 2q14.3-q21; 2q37; 3p12; 3p21-p26; 3q24-q25; 3q26.1-q29; 4p15.3-p16; 4q31.1-q35; 5p12-p15.3; 5q12-q14; 5q31-q35; 6p12-p21.3; 6q22-q23; 6q24-q27; 7p11.2-p15; 7p21-p22; 7q31-q36; 8p12-p21; 8p23; 8q23-q24.3; 9p23-p24; 9q31-q33; 9q34; 10p11.2-p15; 10q23-q26; 11p13-p14; 11p15; 11q22-q25; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 13q21-q22; 13q31; 13q32-q34; 14q23-q32; 16p12-p13.3; 16q23-q24; 17p11.2-p12; 17p13; 17q21-q22; 17q23-q25; 18p11.2-p11.3; 18q21-q23; 19p13.1-p13.3;	1p21-p31; 1q21-q32; 1q32; 1q42-q44; 2p12; 2q11.2-q14.3; 2q24; 2q32; 2q35; 3q13.1; 4q12-q21; 4q23-q28; 5q11.2; 5q14-q23; 6q12-q21; 7q11.2; 7q11.2-q22; 8q11.2-q21.1; 8q21.2-q21.3; 9p12-p23; 9q21-q22; 10q11.2-q21; 11q12-q13; 11q14-q22; 12q12-q13; 12q13-q21; 13q14; 14q11.2-q12; 14q13-q21; 16p11.2; 18q11.2-q12; 20p11.2; Xp11.2; Xq12-q13; Xq23

	19q13.1-q13.4; 20p12; 20p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp11.4-p22.3; Xq13-q21; Xq21-q22; Xq26-q28; Yq11.2; Yq11.2	
AP19	1p12-p36.3; 1q21-q41; 1q42-q44; 2p12-p16; 2p21-p25; 2q12-q22; 2q33; 2q35-q37; 3p13-p21; 3p22-p24; 3q21-q25; 3q28-q29; 4p15.1-p16; 4q26; 4q31.3-q32; 4q35; 5p13-p14; 5p15.1-p15.3; 5q23-q31; 5q32-q35; 6p12-p22; 6p23-p25; 6q15-q27; 7p12-p22; 7q31; 7q32-q33; 8p22; 8q24.1-q24.3; 9p21-p23; 9q21-q34; 10q21; 10q24-q25; 10q26; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q22-q24.3; 13q13-q21; 13q32-q34; 14q24-q31; 15q15-q26; 16p11.2-p13.2; 16q12.1-q13; 16q22-q24; 17p11.2-p12; 17p13; 17q12-q25; 18p11.2-p11.3; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.2; 20p12-p13; 20q11.2-q11.3; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p11.3; Xp22.2-p22.3; Xq13-q21; Xq21-q24	3p12; 3p21; 3q13.1-q13.3; 4q12-q13; 4q22; 4q28-q31.1; 7q11.2; 7q21-q22; 8p11.2; 8q12; 10q11.2; 10q22-q23; 11p11.2-p14; 11q12; 12p11.2-p12; 12q12; 13q12; Xp11.2; Xq25-q28; Yq11.2
AP28	1p32-p33; 1p34.3-p36.3; 1q32-q42; 1q43-q44; 2p12-p13; 2p16-p25; 2q14.1-q21; 2q36-q37; 3p21-p22; 3p24-p26; 3q21-q24; 3q26.3-q29; 4p12-p16; 4q12-q21; 4q26-q27; 4q28-q35; 5p12-p13; 5p13-p15.2; 6p12-p23; 6q14-q15; 6q16-q22; 6q23-q27; 7p11.2-p13; 7p13-p15; 7p15-p22; 7q22-q36; 8p11.2-p12; 8p21-p23; 8q11.2-q12; 8q21.1; 8q23-q24.3; 9p12-p13; 9p21-p23; 9q21-q31; 9q34; 10p11.2-p15; 10q11.2-q26; 11p11.2-p15; 11q13-q14; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q13-q14; 12q15-q21; 12q21-q23; 12q24.1-q24.3; 13q14; 13q21; 13q31-q34; 14q21-q22; 14q23-q24; 14q31-q32; 15q13-q21; 15q23-q26; 16p11.2-p13.3; 16q11.2-q23; 16q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2; 20q13.1-q13.3; Xp11.2-p11.4; Xp21-p22.3; Xq12-q13; Xq21-q24; Xq25-q26; Xq27; Yq11.2	1p22-p31; 1q22-q31; 2p11.2; 2q11.2-q12; 2q31-q33; 3p12; 3q12-q13.2; 4q24-q26; 5q12-q13; 5q23-q31; 5q31; 8q21.3-q22; 13q22-q31; 15q21-q22; 22q11.2-q12; 22q13
AP29	1p12-p21; 1p22-p36.3; 1q21; 1q23-q44; 1q43-q44; 2p13-p25; 2q14.3-q33; 2q35-q37; 3p13-p21; 3p24-q26; 3q13.3-q26.1; 3q27-q29; 4p15.3-p16; 4q21-q22; 4q28-q31.1; 4q31.2-q32; 4q33-q35; 5p12-p13; 5p14-p15.3; 5q13-q15; 5q21-q35; 6p12-p25; 6q12-q13; 6q16-q27; 7p11.2-p22; 7q11.2-q21; 7q21-q36; 8p11.2-p23; 8q11.2-q22; 8q24.1-q24.3; 9p12; 9p22-p23; 9p23-p24; 9q21; 9q22; 9q31-q34; 10p12-p15; 10q11.2-q26; 11p15; 11q13; 11q22; 11q25; 12p13; 12q13-q15; 12q23-q24.3; 13q34; 14q11.2-q12; 14q24; 14q31-q32; 15q21-q26; 16p11.2-p13.3; 16q22-q24; 17p13; 17q11.2-q22; 17q24-q25; 18q11.2; 18q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q11.2-q21; 21q22; 22q12-q13; Xp22.1-p22.2; Xq21; Xq23-q27; Xq28	1p21-p22; 3p12; 3q13.1-q13.3; 9p13; 11p11.2; 11p12-p14; 11q12-q13; 11q23; 12p11.2-p12; 12q12-q13; 13q12-q13; 13q21-q33; 14q12-q13; 14q22; 15q11.2-q14; 18p11.2; 18q11.2-q21; Xp11.2-p21; Xq12-q13; Yp11.2-p11.3; Yq11.2
AP34	1p12-p13; 1p31-p36.3; 1q21-q23; 1q31; 1q42-q43; 1q44; 2p11.2; 2p22-p25; 2q11.2-q14.3; 2q33-q36; 2q37; 3p12-p26; 3q13.1-q29; 4p14-p16; 4q22-q24; 4q28; 4q32-q35; 5p12-p14; 5p15.2-p15.3; 5q11.2-q14; 5q21-q22; 5q31-q32; 5q35; 6p12-p24; 6q26-q27; 7p11.2-p22; 7q11.2-q21; 7q22-q34; 7q36; 8p12-p21; 8p22-p23; 8q11.2-q21.1; 8q21.3-q22; 8q24.1-q24.3; 9p13-p22; 9p23-p24;	1p21; 1q24; 1q31-q41; 2p13; 2p16; 2q22; 2q24-q32; 3p12; 4p12-p14; 4q12; 4q21; 4q31.1-q31.3; 5q23; 5q33-q34; 6q22-q24; 8p21-p22; 8q22-q23; 9q33-q34; 10p12; 11p11.2-p14; 12p11.2-p12; 12q21-q22; 16q12.2-q21; 17q23-q24; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q21-q22

	9q22; 9q31; 9q34; 10p11.2; 10p14-p15; 10q21-q22; 10q23-q24; 10q26; 11p15; 11q12-q14; 11q22-q25; 12p13; 12q13-q14; 12q23-q24.3; 13q12-q21; 13q31-q34; 14q11.2-q21; 14q22-q32; 15q13-q21; 15q22-q25; 15q26; 16p11.2-p13.3; 16q22-q24; 17p12-p13; 17q11.2-q21; 17q25; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp11.2; Xp21-p22.3; Xq12-q21; Xq23-q25; Xq26-q28; Yp11.2; Yq11.2	
AP37	1p21-p22; 1p31; 1q32; 2q23-q32; 3p12; 3p13; 3q12-q13.3; 3q21-q22; 3q24-q26.2; 4p13; 4q22; 4q26-q27; 4q28-q31.1; 5q13-q21; 5q31; 6p11.2-p12; 6q12-q25; 7p14; 7q21; 7q31-q32; 8p11.2-p12; 8q12-q21.2; 8q21.3; 9q22; 9q31-q33; 10q21; 11q14-q23; 12q12-q23; 13q12; 13q13-q31; 14q12-q24; 15q13-q14; 15q21-q22; 16p12; 18p11.3; 18q11.2-q12; 18q21-q22; 21q21; Xp11.4-p21; Xq22-q25	1p33-p36.3; 1q21; 1q21-q23; 1q41-q44; 2p13; 2p22-p25; 2q36-q37; 3p24; 3p25-p26; 3q27-q29; 4p15.3-p16; 4q34-q35; 5p13-p15.3; 5q33-q34; 5q34-q35; 6p22-p25; 6q26-q27; 7p15-p22; 7q36; 8p21-p23; 8q24.1-q24.3; 9p23-p24; 9q34; 10p11.2-p12; 10p12-p15; 10q22-q23; 10q25-q26; 11p14-p15; 11q12-q13; 11q23; 11q24-q25; 12p13; 12q24.1; 12q24.3; 13q32-q34; 14q32; 15q25; 15q26; 16p13.1-p13.3; 16q23-q24; 17p11.2-p13; 17q24-q25; 18q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p13; 20q13.1-q13.3; 21q22; 22q13; Xp22.1-p22.3; Xq27-q28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2
AP39	1p12-p13; 1p22; 1p22-p36.3; 1q21-q24; 1q25; 1q32; 1q32-q41; 2p12-p13; 2p21-p22; 2p23-p24; 2q11.2-q13; 2q14.1-q14.2; 2q24; 2q35-q37; 3p14-p21; 3p21; 3p23-p24; 3q13.3-q24; 4p14-p16; 4q12-q13; 4q21; 4q26-q27; 4q28-q31.2; 4q34-q35; 5q23-q32; 5q34-q35; 6p12-p21.3; 6p22-p25; 6q25; 7p12-p14; 7p21-p22; 7q11.2-q21; 7q21-q31; 7q32-q33; 7q34-q36; 8p12-p21; 8q24.1-q24.3; 9p12; 9q21-q34; 10p11.2-p14; 10q11.2-q21; 10q21-q23; 10q24-q26; 11p14-p15; 11p15; 11q12-q14; 11q23-q25; 12p12-13; 12q12; 12q13-q14; 12q21-q24.3; 13q33; 14q22; 14q31-q32; 15q22-q26; 16p11.2-p13.2; 16q12.1-q24; 17q11.21-q21; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q12; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p11.3; Xp21-p22.1; Xq12-q21; Xq21-q28	1p13-p21; 2p15-p16; 2q22; 2q22-q23; 2q32-q33; 3p12; 3q12-q13.1; 3q26.1-q27; 4q13; 4q22-q26; 5p12-p15.3; 5q11.2; 5q13; 5q14-q22; 5q23; 6q13-q16; 6q22; 7p21; 8q12-q21.1; 8q21.1-q21.2; 8q21.3-q22; 8q23; 9p23-p24; 11p12-p13; 11p14; 11q14-q22; 11q23; 12p11.2; 12q14-q15; 12q21; 14q11.2-q21; 14q24; 15q13-q14; 15q21; 17p13; Xp21
AP40	1p22-p31; 1p32-p33; 1p35-p36.1; 1q23-q24; 1q31; 1q32-q42; 2p12-p13; 2p15-p23; 2q12-q22; 2q22-q32; 2q35-q37; 3p12-p14; 3p14-p21; 3p21; 3p22-p25; 3q13.1; 3q13.3-q26.3; 4p14-p16; 4q21; 4q26-q34; 5p12-p13; 5p14; 5q11.2-q23; 6p12-p21.3; 6q12-q16; 6q22-q23; 6q24-q25; 7p12-p13; 7p15; 7q32-q35; 8q22-q24.2; 9p21; 9q13-q21; 9q21-q31; 9q31-q32; 9q34; 10q21-q22; 10q24-q25; 10q26; 11q13-q14; 12q13-q21; 12q21-q24.3; 13q12-q14; 13q21; 15q21-q24; 16p11.2; 16p12; 16p13.1; 16q12.2; 16q13-q21; 16q21-q24; 17p11.2; 17q21-q23; 18p11.2; 19p13.1-p13.2; 19q13.2-q13.4; 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.2; 22q11.2-q13; Xp11.2; Xp11.3-p11.4; Xp21; Xq12; Xq13-q21; Xq21-q25	1p12-p13; 1p36.2-p36.3; 1q22-q23; 2p24-p25; 2q32-q33; 2q37; 3q29; 4q12-q13; 5p15.1-15.3; 6p22-p25; 6q21; 6q27; 7p21-p22; 7q11.2; 7q22; 8p21-p23; 8q12-q21.1; 8q21.3; 9p12-p13; 9p23-p24; 10p13-p15; 10q22-q23; 11p11.2-p14; 11p15; 11q12; 11q13; 11q22-q23; 11q24-q25; 12p12-p13; 12p13; 14q11.2-q13; 14q32; 17p13; 17q25; 18q11.2; 18q12-q21; 18q22-q23; 21q21; 22q13; Xp22.2-p22.3; Yp11.2-p11.3
AP41	1p12-p31; 1p31; 1p31-p36.3; 1q21-q22; 1q31-q32; 1q32-q44; 2p14-p16; 2p16-p21; 2p23-p24; 2q11.2-q14.1; 2q21; 2q23-q24; 2q32-q33; 3p12; 3p23-p25; 3q13.3-q24; 4p12-p13; 5p12-p13; 5p14-p15.1; 5p15.3; 5q11.2-q13; 5q14-q15;	3q13.1; 9p24; 11p13-p14; 11p14; 11q13; 13q31-q32; 20q13.2-q13.3

	5q23-q31; 5q31-q34; 6p11.2-p12; 6p21.2-p21.3; 6p22-p23; 6q16-q22; 6q26-q27; 7p11.2-p22; 7q21; 7q22-q31; 7q32; 7q36; 8p11.2-p12; 8p21-p22; 8q11.2-q21.1; 8q21.3-q22; 8q23-q24.3; 9q32; 10p11.2-p12; 10q11.2-q21; 10q22-q23; 10q24; 10q25-q26; 11p15; 11q23-q25; 12p11.2; 12p12-p13; 12q12-q24.3; 13q34; 14q11.2-q24; 15q23-q24; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q13; 16q22-q23; 16q24; 17q11.2-q21; 19p13.2-q13.3; 19q13.1-q13.3; 20p11.2-p13; 21q21-q22; 22q11.2-q13; 22q13; Xp11.2-p11.4; Xp21-p22.1; Xq12-q21; Xq22-q27	
AP43	1p12; 1p21; 1p22; 1p31-p33; 1p34.1-p34.2; 1p34.2-p36.3; 1q21-q25; 1q31-q44; 2p21-p25; 2q14.2-q21; 2q32-q37; 3p12; 3p14-p26; 3q25-q26.1; 3q26.3-q29; 4p15.1-p16; 4q26; 4q33-q35; 5p11-p15.2; 5p15.3; 5q12-q13; 5q14-q15; 5q31-q33; 5q34-q35; 6p12-p21.3; 6p22-p25; 6q14-q22; 6q22-q27; 7q21; 7q31; 7q32-q36; 8p12-p23; 8q13-q21.3; 8q23-q24.3; 9p13-p24; 9q22-q34; 10p11.2; 10p13-p14; 10q21-q22; 10q22-q26; 11p12-p13; 11p14-p15; 11q12-q25; 12p11.2-p13; 12q13; 12q21-q22; 12q23-q24.3; 13q13-q33; 14q24-q32; 15q22-q24; 15q25-q26; 16p11.2-p13.3; 16q13-q24; 17p11.2-p12; 17q21; 17q22-q25; 18q12-q21; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.2; 19q13.3-q13.4; 20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21; 21q22; 22q12-q13; Xp21-p22.3; Xq23-q25; Yp11.2	2p11.2-p12; 2q22; 2q23-q24; 3q12-q13.2; 4p12-p14; 4q28; 5q11.2; 5q23; 6p12; 6q13; 7p11.2-p14; 7p15; 7p21-p22; 7q31; 8q21.3-q22; 9q21; 10p12-p13; 10q11.2-q21; 11p14; 12q13-q21; 13q34; 14q11.2-q21; 15q11.2-q12; 15q14-q15; 15q21; 17q11.2-q21; 18p11.2-p11.3; 18q11.2; 18q21-q22; Xp11.2; Xq12-q21; Xq21-q22; Yq11.2
AP45	1p13-p21; 1p31; 1p31-p33; 1q24-q41; 1q43-q44; 2p13-p16; 2q22; 2q24-q32; 2q33-q36; 3p13-p21; 3q13.1-q13.3; 3q21-q23; 3q24-q25; 4p13; 4q31.1-q31.3; 5p12-p14; 5q13-q23; 5q31; 5q32-q34; 6p21.2-p22; 6p22; 6q16-q21; 6q25-q27; 7p12-p13; 7p21-p22; 7q31-q35; 8q11.2-q12; 8q21.1-q22; 8q23-q24.3; 9p12; 9p21-p23; 9q13-q34; 10p11.2-p12; 10q11.2-q22; 10q23-q25; 12q12-q13; 12q21; 12q23-q24.2; 13q21-q31; 14q21-q22; 14q23-q24; 15q12-q15; 16p11.2-p13.1; 12q21; 12q23-q24.2; 13q21-q31; 14q21-q22; 14q23-q24; 15q12-q15; 16p11.2-p13.1; 16q22-q24; 17p11.2-p12; 17q12-q22; 18q12-q21; 19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.4; 20q11.2-q12; 21q21-q22; 22q13; Xq21-q23	2p24-p25; 3q28-q29; 4q13-q24; 6p23-p25; 6q12; 11p11.2-p12; 11p14; 11p14-p15; 11p15; 11q23-q25; 12p11.2-p12; 12q24.3; 14q21; 14q24-q31; 14q32; 15q26; 17p11.2; 17q24-q25; 18q22-q23; 22q11.2-q12; Xp22.1-p22.3; Xq13; Yp11.2-p11.3; Yq11.2
AP46	1p22-p31; 1p32-p34.1; 1p36.2-p36.3; 1q22-q41; 2p22-p24; 2q11.2-q12; 2q37; 3p12-p26; 3q25-q26.3; 4p15.1-p16; 5q11.2-q12; 5q13; 5q23; 5q31-q35; 6p12; 6p21.3; 6q24-q27; 7p15; 7q22-q31; 7q32-q33; 7q34-q35; 7q36; 8p21-p23; 8q21.3; 8q22-q24.3; 9p13-p21; 9q13-q21; 9q22-q34; 10p11.2-p12; 10p12; 10p14; 10p15; 10q21-q23; 10q25; 11q13; 11q14-q21; 11q25; 12p13; 12q21-q23; 13q22-q31; 14q11.2-q12; 15q14-q15; 15q22-q24; 15q24-q25; 15q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17q12-q24; 17q25; 18q11.2-q12; 18q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 21q21-q22; Xp11.3-p11.4; Xq24-q26	1p12-p21; 1q21; 1q41-q42; 1q43-q44; 2p11.2-p12; 2p13-p14; 2q21-q22; 2q22-q23; 2q31-q32; 2q32-q33; 3q13.1-q13.3; 3q23; 3q28; 3q29; 4q12; 4q13-q25; 4q26-q31.3; 5p15.2-p15.3; 5q14-q21; 6q12; 6q22; 7p11.2-p12; 7p21; 7q11.2-q21; 7q31; 8p11.2; 8p12; 9q21; 10q23-q24; 11p11.2-p12; 11p14; 11q22-q23; 12p11.2-p12; 12q12; 12q14-q21; 12q24.3; 14q12-q13; 14q21-q23; 14q24-q31; 17p11.2-p12; 17p13; 18p11.2; 20q12-q13.2; 22q11.2; 22q13; Xp21-p22.2; Xq21-q22; Xq27; Yp11.2
AP47	1p22; 2p14; 2p21; 2p22-p24; 2q31-q33; 2q35-q36; 3q24-q25; 5q31; 5q35; 6p21.1-p21.3; 6p22; 6q16-q25; 6q26-q27; 7q22-q31; 11q13-q22; 11q23-q25;	1q21-q31; 1q31; 2q37; 3p12-p13; 3p14; 3p21-p26; 3q12-q13.3; 3q27-q29; 4p12-p14; 4p15.3-p16; 4q13; 4q28; 4q32; 5p13-p15.3; 5q11.2-q12; 5q21;

	12q24.3; 13q14; 13q22; 13q31-q33; 13q34; 14q24; 16p12-p13.3; 17p13; 17q21; 18q22-q23; 19p13.2-p13.3; 19q13.1-q13.2; 20q12; 20q13.1-q13.2; Xp11.2-p11.4; Xq13-q21	5q23; 7p11.2-p13; 7q11.2-q21; 7q32-q33; 8p11.2; 8p12; 8p23; 8q12-q13; 8q21.3-q22; 9p12-p13; 9q21-q22; 10p11.2-p12; 10q11.2-q21; 10q24; 10q26; 12p11.2-p12; 12p13; 12q12; 12q14; 14q11.2-q12; 14q21-q22; 15q11.2-q26; 16p11.2; 16q12.1-q13; 17q22-q23; 17q25; 18p11.2; 18q11.2-q12; 21q11.2-q21; 22q13; Yp11.2-p11.3
AP49	1p21; 2p14-p16; 2q32-q36; 3p12; 3q13.1-q13.3; 5q21-q22; 6q12-q13; 6q22; 6q23-q24; 7q22; 7q31-q35; 8p11.2-p12; 12q14-q22; 13q21; 15q21-q22; 20q13.2; 21q21; Xp11.3-p11.4; Xq23-q27	1p12-p13; 1p34.3-p36.3; 1q22-q25; 1q32; 1q41-q42; 1q42-q44; 2p22-p25; 2q36-q37; 2q37; 3p13-p21; 3p24-p26; 4p15.2-p15.3; 4p16; 5p14-p15.3; 5q35; 6p21.3; 6p23-p25; 6q26-q27; 7p21-p22; 7q11.2-q21; 7q36; 8p21; 8p23; 8q24.1-q24.3; 9p23-p24; 9q21; 9q33-q34; 10p14-p15; 10q21; 10q25-q26; 11p11.2-p12; 11p14; 11p15; 11q12-q14; 11q23-q25; 12p13; 12q24.3; 13q12-q13; 13q32-q34; 14q11.2-q12; 14q24; 14q24-q32; 15q12; 16p13.2-p13.3; 16q21-q22; 16q23-q24; 17p12-p13; 17q23-q25; 18p11.2-p11.3; 19p13.1-p13.2; 19p13.3; 19q13.1-q13.4; 20q13.3; 21q22; 22q13; Xp21-p22.3; Yp11.2-p11.3; Yq11.2
AP50	1p13-p36.3; 1q21-q22; 1q31; 1q32-q43; 1q44; 2p12-p13; 2p14; 2p16-p25; 2q14.3-q22; 2q31-q32; 2q37; 3p23-p26; 3q25-q26.1; 3q27-q28; 4p15.1-p16; 4q12-q13; 5p12-p13; 5p14-p15.3; 5q31-q35; 6p12; 6p21.3-p22; 6q22-q25; 7p13-p15; 7p21-p22; 7q11.2-q21; 7q22-q31; 7q36; 8p11.2-p12; 8p21-p22; 8q23-q24.1; 8q24.1-q24.3; 9p12-p23; 9q13-q22; 9q32-q34; 10p12-p14; 10q11.2-q21; 10q23-q26; 11p11.2; 11p12-p14; 11p15; 11q13-q14; 11q24-q25; 12p12-p13; 12q12-q21; 12q21-q24.3; 13q12; 13q14; 13q34; 14q24-q32; 15q12-q15; 15q24-q25; 16p11.2; 16p12-p13.3; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18q11.2-q22; 19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q12; 20q13.1-q13.3; 21q22; 22q12; 22q13; Xq23-q27; Xq28; Yq11.2	1q23-q25; 2p11.2-p12; 2q24; 2q24-q31; 2q32; 3p12-p14; 3p21; 3q13.1-q21; 3q21; 3q23-q24; 4q22; 4q27-q32; 4q35; 5q11.2-q12; 5q15-q21; 5q23; 6p22-p23; 6q12-q13; 6q21-q22; 7q32-q34; 8p23; 8q21.1-q21.3; 8q22; 13q21-q22; 13q31-q33; 14q12-q21; 15q21-q22; 16q22-q23; Xp22.1-p22.3; Xq12-q13; Xq21
AP51	1p21; 1p32-p36.1; 1q32-q44; 2p22; 2q33-q37; 3p21; 3q21-q22; 3q24-q27; 4p14-p15.3; 4q31.3-q34; 5p14-p15.1; 5q23-q35; 6p22-p23; 6q23-q26; 7p12-p21; 7q22-q36; 8p12-p22; 8q22-q24.2; 9q22-q34; 10p12; 10p13-p15; 10q23-q26; 11p13-p15; 11q24-q25; 12q21-q24.3; 13q12-q14; 13q21-q34; 14q22-q32; 15q15; 15q21-q26; 16p12-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q22; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.2; 22q13; Xp21; Xq24-q27; Yq11.2	1p12-p13; 1p22-p31; 1q21-q24; 2p11.2-p12; 2q11.2-q13; 3p12; 3q13.1-q13.3; 4q12-q28; 5q11.2-q22; 6q12-q15; 7q11.2-q21; 8q12-q13; 9p12-p13; 9q21; 10q11.2-q21; 11p11.2-p12; 11q12-q13; 12p11.2-p12; 12q12-q13; 14q11.2-q12; Xq13-q21
AP53	1p21; 1p22-p31; 1p31-p33; 1q32; 2q33; 3q13.1-q22; 3q25-q26.3; 4p14-p15.1; 4q26-q28; 4q31.2-q32; 5p12-p14; 5q11.2-q13; 5q14; 6p21.1-p21.2; 6q15-q21; 7p15-p21; 8q23-q24.1; 9p21; 10q24-q25; 11q23-q24; 12q23-q24.1; 14q12-q24; 14q32; 18q11.2-q12; 20p11.2-p12; Xp11.2-p11.3; Xq21; Xq21-q24	1p13; 1p34.2-p36.2; 1q21-q24; 1q42-q43; 2p11.2-p16; 2p21-p22; 2q11.2-q12; 2q14.1-q23; 2q37; 3p24-p26; 5p15.2-p15.3; 5q21-q23; 5q31; 5q35; 6p25; 6q26-q27; 7q11.2; 7q31; 7q32; 7q36; 8q21.1-q22; 9p24; 9q12-q22; 9q34; 10p15; 10q11.2-q21; 10q21; 11p11.2-p12; 11p15; 11q12-q13; 12p12-p13; 12q24.3; 13q13-q21; 15q25-q26; 16p13.1; 16p13.3; 16q23-q24; 17p11.2; 17q23-q24; 17q25; 19p13.3; 20p13; 20q12-q13.3; 22q11.2-q13

AP54	1p21; 1p22-p31; 2p12-p13; 2p13-p15; 2p21; 2q13-q14.1; 2q21; 2q24; 2q31-q32; 2q33-q34; 3p12; 3q12-q22; 3q25-q26.2; 5q13; 5q21; 6p12-p21.1; 6q13-q22; 6q22; 7p12-p13; 9p21; 10q11.2-q21; 10q21; 10q24-q25; 12q14-q21; 13q21; 15q21; 18p11.2; 18q11.2-q12; 18q21; Xq22-q24	1p35-p36.3; 2p24-p25; 2q37; 4p16; 5p15.2-p15.3; 6p24-p25; 6q27; 8p22-p23; 8q24.2-q24.3; 10p15; 11p15; 12p13; 17p13; Yp11.2-p11.3
AP55	1p13-p31; 1q21; 1q31; 1q32-q41; 2p12-p16; 2q13-q21; 2q23-q32; 3p12-p13; 3q13.1-q22; 3q22-q23; 3q22-q23; 3q24-q25; 4p14; 4p15.1-p15.3; 4q13-q21; 5q13-q14; 5q15-q23; 6p11.2-p21.1; 6q12-q23; 8p11.2-p12; 8q11.2-q12; 8q21.1-q21.3; 9p21; 9q31-q32; 10q11.2-q22; 10q24-q25; 12q13; 12q15-q24.3; 13q14-q31; 15q21; 16p11.2-p13.2; 16q22; 17q21-q22; 18q11.2-q12; 19p13.1-p13.2; 19q13.1-q13.2; Xq22-q24	1p36.1-p36.3; 2p25; 2q37; 3q29; 5p15.2-p15.3; 6p24-p25; 7p22; 8p23; 8q24.3; 9p23-p24; 10p14-p15; 11p15; 11q24-q25; 12p13; 14q32; 17p13; 19q13.4; 20q13.3; Xp22.1-p22.3; Yp11.2-p11.3
CAC		
CAC	1q32; 1q43-q44; 2p12-p16; 2p16-p22; 2p23-p24; 2q13-q22; 2q23-q24; 2q31; 2q33-q35; 3p21-p22; 3q23; 3q24-q25; 3q26.3; 4p16; 4q22-q26; 4q28-q31.1; 4q33-q34; 5p13-p14; 5q22; 5q31; 5q34-q35; 6q25; 7p14-p15; 7p15; 7p21-p22; 7q11.2; 7q22; 7q31; 7q31-q36; 8p21-p22; 8q13; 8q23-q24.1; 9q22-q31; 9q32-q34; 10q21; 10q23-q24; 10q24-q25; 10q26; 11q12-q13; 11q23; 12q22-q23; 12q24.3; 13q22-q31; 14q21; 14q24; 16p11.2-p13.2; 16q22; 16q23-q24; 18p11.3; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19p13.2; 19q13.4; 21q22; 22q13; Xp11.3-p11.4; Xp21-p22.1; Xp22.1-p22.3; Xq13; Xq23; Xq27; Yp11.2	-
CDS		
CDS2	1p32-p31; 1p31-p34.2; 1q23-q25; 1q31; 1q31-q44; 2p13-p24; 2q14.2-q21; 2q24; 2q36-q37; 3p12-p21; 3p21-p22; 3p24-p25; 3q13.3-q23; 3q24-q25; 3q26.1-q29; 4q24; 4q28-q31.1; 4q32-q34; 5p12-p14; 5q13-q15; 5q23-q31; 5q32-q35; 6p12-p21.1; 6p21.3-p25; 6q16; 6q21-q27; 7p11.2-p13; 7p14-p22; 7q21-q36; 8p11.2-p12; 8p12-p21; 8p22-p23; 8q13-q21.1; 8q21.3; 8q22-q24.1; 9q21; 9q21-q34; 9q34; 10p11.2-p12; 10q22-q23; 10q24-q26; 11p14-p15; 11q14-q23; 11q24-q25; 12p12-p13; 12q12-q24.3; 13q12-q33; 14q22-q32; 15q22-q26; 16p11.2-p13.3; 16q22-q24; 17p12-p13; 17q11.2-q25; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.4; 20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p21; Xq21-q23; Xq26	1q21; 3q13.1; 4p12-p13; 4p16; 4q12-q13; 7q11.2; 9p12-p13; 11q12-q13; 12p11.2-p12; 14q11.2; 15q12-q14; 15q22; 18q21; Yp11.2-p11.3; Yq11.2
CDS3	1p31-p36.3; 1q24; 1q41-q44; 2p13; 2p21-p25; 2q35-q37; 3p21; 3p24-p25; 3q27-q29; 4p15.3-p16; 4q34-q35; 5q35; 6p12-p25; 6q21-q22; 6q27; 7p15-p22; 7q34-q36; 8p11.2-p21; 8p23; 8q21.3; 8q23-q24.3; 9p21-p23; 9p24; 9q22-q31; 9q34; 10p14-p15; 10q25-q26; 11p14-p15; 11q13-q14; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 13q32-q34; 14q23-q32; 15q21-q25; 15q26; 16p11.2-p13.3; 16q21-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2; 18p11.3; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.2; 19q13.4; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp22.1;	1p21-p22; 1p31; 2p11.2-p12; 2q14.3-q21; 2q22-q31; 2q32; 2q32-q33; 3p13-p14; 3q13.1-q21; 3q26.1-q26.3; 4p12-p13; 4q12; 4q13-q21; 4q23-q28; 4q32; 5p11-p14; 5q11.2-q14; 5q21-q23; 5q31-q32; 5q34; 6q12-q16; 6q22-q24; 7q11.2; 7q21-q22; 8q21.1-q21.2; 9p12-p13; 9q21-q22; 10p11.2-p12; 10q21; 10q22; 10q23; 11p13-p14; 11q12-q13; 11q22; 12q12; 12q21; 13q12-q13; 13q14-q22; 14q11.2-q13; 14q21; 16q12.1-q12.2; 18q11.2; 18q12; 21q21; Xp11.2; Xp11.3-p21; Xq12-q13; Xq25

	Xp22.3; Xq13-q21; Yq11.2	
CDS5	1p31; 1p32; 1p34.1-p36.3; 1q32-q41; 2p12-p14; 2p15-p16; 2p22-p25; 2q33-q37; 3p13-p14; 3p22-p26; 3q23-q29; 4p15.3-p16; 4q31.1-q32; 4q32-q33; 4q35; 5p15.1-p15.3; 5q13-q14; 5q23-q31; 5q32-q35; 6p22-p25; 6q25-q27; 7p15-p22; 7q32-q36; 8p11.2-p12; 8q22; 8q24.1-q24.3; 9p23-p24; 9q22-q34; 10p12-p13; 10p14-p15; 10q23-q26; 11p11.2; 11p15; 11q12-q13; 11q24-q25; 12p12-p13; 12q12; 12q14; 12q21-q24.3; 13q21-q31; 13q32-q34; 14q13-q32; 15q21-q22; 15q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17p12-p13; 17q21-q25; 18q12-q21; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xq21; Xq21-q22; Xq28; Yq11.2	1p22; 1q21-q24; 1q42; 2q22-q31; 3p21; 3q13.1-q13.2; 4p12-p15.1; 4q12-q31.1; 5p12-p14; 5q21-q22; 6p12-p21.3; 6q12-q13; 6q14-q24; 7p11.2-p12; 7p14; 7q11.2-q21; 7q31; 8q21.2-q21.3; 9p12-p13; 9p21; 10p11.2; 10q21; 11p12-p14; 11q22-q23; 12q13; 13q12-q13; 15q15-q21; Xp11.2-p21; Xp21-p22.1; Xq26; Yp11.2-p11.3
CEM		
CEM1	1p22-p33; 1p35-p36.1; 1q24; 1q42-q44; 2p13-p14; 2p15-p16; 2p22-p24; 2q21; 2q24; 2q32-q36; 2q37; 3p25-p26; 3q24; 4p14; 4p15.3-p16; 4q12; 4q31.1-q31.2; 4q32; 5q34-q35; 6p22; 6q13-q15; 6q16-q23; 6q24-q27; 7p14-p15; 7q31; 7q32-q36; 8p12-p21; 8p22; 8q13-q21.1; 9p13-p21; 9q22-q33; 9q34; 10q11.2-q21; 10q22; 10q24-q26; 11q22-q23; 12q21-q22; 12q24.3; 14q22-q24; 14q32; 15q21; 15q22-q26; 16q12.1-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12; 18q21-q23; 19p13.1-p13.2; 19q13.1-q13.3; 20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q12; 20q13.2-q13.3; 21q11.2-q22; 22q12-q13; Xq22-q24; Xq27-q28; Yq11.2	1q21-q23; 1q31; 2p25; 2q11.2; 4q22-q24; 5p13-p14; 5q22-q23; 5q32; 7q11.2; 8q24.3; 10q22-q23; 11p15; 11q12-q13; 12p11.2; 12q12; 13q21; Xp22.1-p22.2; Xq25-q27; Yp11.2-p11.3
CEM2	1p21-p22; 1p22-p31; 1p31-p36.3; 1q24-q44; 2p15; 2p22-p25; 2q32-q37; 3p13-p22; 3p23-p26; 3q21-q22; 3q24-q29; 4p15.3-p16; 4q28-q32; 5p13; 5p14; 5p15.1-p15.3; 5q11.2-q13; 5q21; 5q22-q23; 5q23-q35; 6p11.1-p12; 6p21.3-p22; 6p23-p25; 6q16; 6q21; 6q22-q27; 7p11.2-p22; 7q11.2-q21; 7q21-q36; 8p11.2-p23; 8q23-q24.3; 9p12-p13; 9p13-p21; 9p22-p23; 9q13-q21; 9q22-q34; 10p11.2-p12; 10p12; 10p14-p15; 10q11.2-q21; 10q22; 10q24-q26; 11p11.2-p15; 11q12-q25; 12q15-q21; 12q22-q24.3; 13q14-q32; 13q34; 14q21-q24; 14q24-q32; 15q11.2-q15; 15q21-q22; 15q22-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; Xp11.2-p11.3; Xp22.1-p22.2; Xq12-q13; Xq13-q21; Xq23-q24; Xq25-q28; Yq11.2	2p12; 3q13.1-q13.2; 4p14; 4q23-q24; 4q26; 4q27-q28; 5q14; 8q21.2-q21.3; 13q12; 22q13
CXAP		
CXAPI	1p21-p22; 1p31; 1p34.2-p36.3; 1q21-q22; 2q34-q36; 3p14; 4p15.1-p15.3; 4q12-q13; 5p14-p15.3; 5q33-q34; 6p12-p25; 6q12-q14; 6q22; 6q23-q27; 7p15-p22; 7q31; 7q33-q36; 8p21-p22; 8q23; 9p12-p23; 9q12-q22; 9q34; 10p13-p15; 10q11.2-q21; 10q26; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q22-q24.3; 13q12; 13q21; 13q22-q31; 13q33-q34; 14q24; 14q31-q32; 15q21-q23; 16p12-p13.1; 16q12.1-	1p22-p31; 1q23-q24; 1q25-q31; 2p11.2; 2p14-p15; 2p16-p21; 2q11.2-q13; 2q14.2-q14.3; 2q22-q23; 2q24-q33; 3p21; 3q13.1; 3q21-q24; 4q24-q26; 4q34-q35; 5q11.2-q12; 5q14-q21; 5q21-q31; 7p13-p15; 7q31-q32; 8q21.3; 8q22-q23; 10q23-q24; 11p11.2-p12; 11p14-p15; 11q12-q13; 11q13-q14; 12q14-q21; 13q14; 17q21; 18p11.2-p11.3; 18q23

	q13; 16q23-q24; 17q24-q25; 18q12-q21; 18q21; 19q13.2-q13.4; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp21; Xq12-q13; Xq21; Xq25-q26	
CXAP2	1p12-p13; 1p31-p36.3; 2p11.2-p13; 2p14-p16; 2p22-p24; 2q21-q22; 2q37; 3p12-p14; 3p21; 3p24-p25; 3q21-q26.1; 3q29; 4p12-p15.1; 4p15.3-p16; 4q12-q13; 5p12-p15.3; 5q11.2-q21; 5q23-q32; 6p21.1-p22; 6q14-q22; 6q23-q27; 7p11.2-p22; 7q11.2-q21; 7q21-q22; 7q31-q36; 8p11.2-p12; 8p22-p23; 8q12; 8q23-q24.3; 9p12-p21; 9q21-q22; 9q31-q34; 10p11.2-p12; 10p14-p15; 10q11.2-q24; 10q24-q26; 11p11.2-p12; 11p14-p15; 11q12-q14; 12p11.2-p12; 12q14-q15; 12q24.2-q24.3; 13q14; 13q21; 13q22-q31; 13q32-q34; 14q11.2-q21; 14q21-q32; 15q12-q25; 16p11.2-p13.1; 16p13.2-p13.3; 16q12.1-q22; 16q23-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q21; 17q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q21; 19p13.2-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2; 20p12-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; Xp11.2-p11.4; Xq12-q24; Yq11.2	1p21; 1q22-q23; 1q24-q31; 1q41-q43; 2q33-q36; 4q22-q26; 4q27-q34; 8q21.2-q22; 9p23-p24; 11p12-p14; 12p13; 13q12-q14; 15q26; Yp11.2
CXAP3	1p13-p35; 1p36.2-p36.3; 1q24-q44; 2p12-p13; 2p14-p24; 2q13-q14.1; 2q21-q22; 2q33-q37; 3p12-p14; 3p21-p24; 3q21-q26.3; 4p14-p16; 4q13-q21; 4q22-q24; 4q31.1-q35; 5p12-p13; 5p14-p15.3; 5q11.2-q13; 5q13-q14; 5q21; 5q23-q32; 5q33-q35; 6p12; 6p21.2-p25; 6q16-q22; 6q23-q27; 7p12-p22; 7q11.2-q21; 7q31-q36; 8p11.2-p22; 8q23-q24.3; 9p12-p24; 9q21-q34; 10p11.2-p12; 10q11.2-q23; 10q25-q26; 11p11.2; 11p14; 11q23-q25; 12p11.2-p12; 12p12-p13; 12q21-q23; 13q21-q22; 14q11.2-q21; 14q21-q32; 15q12-q26; 16p11.2-p13.2; 16q12.2-q24; 17p11.2-p12; 17q12-q22; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q21; 18q23; 19q13.1; 19q13.4; 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q13; Xp11.3-p21; Xp21-p22.1; Xp22.1-p22.2; Yq11.2	2q31-q32; 10p15; 12q14-q15; 13q310q32; Yp11.2-p11.3
CXAP4	1p12-p22; 1p31-p36.1; 1q32-q44; 2q12-q14.1; 2q34-q37; 3q21-q22; 3q24; 3q29; 5q23-q31; 5q32-q35; 6p23-p26; 6q27; 7p11.2-p15; 7q11.2-q21; 7q22-q31; 7q35-q36; 9p12-p23; 9q13-q22; 9q31-q33; 10q11.2-q22; 10q24-q26; 11q12-q23; 12p12; 12q21-q24.3; 14q12-q13; 14q21-q24; 14q32; 15q14-q15; 15q24-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q12.2; 17p11.3-p13; 17q12-q21; 18q11.2-p11.3; 18q12; 19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.3; 20p12; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q13; Xp11.2; Xp11.4; Xp22.1-p22.3; Xq12-q21; Yp11.2; Yq11.2	2q33; 4q21; 4q24-q28; 4q32; 5p13-p14; 5q21-q23; 6p11.2-p12; 6p24-p25; 6q12-q13; 6q15-q16; 7p21; 7p22; 8p12-p21; 8p22-p23; 8q21.3-q23; 11p11.2-p14; 12p11.2-p12; 12q14-q15; 13q12-q14; 13q22-q34; Xq23-q24
CXAP5	1p13-p31; 1q21-q41; 1q42; 2p12-p25; 2q14.1-q34; 3p14-p22; 3p24-p25; 3q13.1-q26.1; 4p12-p13; 4p14-p15.3; 4p16; 4q21-q27; 4q28; 5q12-q32; 6p11.2-p21.1; 6q21.3; 6p23-p25; 6q12-q22; 6q22; 6q23-q25; 7p11.2-p15; 7p21-p22; 7q11.2-q31; 8p11.2-p12; 8q11.2-q22; 9p12-p21; 9q21-q34; 10p11.2-p12; 10q11.2-q22; 10q24-q25; 11p11.2-p13; 11p14-p15; 12q12-q13; 12q13-q14; 12q21-q22; 13q13-q21; 13q21-q31; 14q12; 14q13-q31; 15q15-q22; 15q24;	2q36-q37; 4q35; 7q35-q36; 8p22-p23; 8q24.1-q24.3; 9p23-p24; 9q34; 11q13-q14; 11q24-q25; 13q34; 16p13.2-p13.3; 19p13.1-p13.2; 19p13.2-p13.3; 19q13.1-q13.2; 19q13.3; 20q13.2-q13.3

	16p11.2-p12; 16q12.2-q22; 16q23; 17p11.2; 17q11.2-q24; 18p11.2; 18q21; 20q11.2-q12; 22q12-q13; Xp11.2-p22.3; Xq12-q21; Xq21-q25; xq28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2	
CXAP6	1p13; 1p22; 1p31-p34.1; 1q31-q32; 2p14-p24; 2q12-q13; 2q23-q24; 2q31-q33; 3p12-p13; 3p21; 4q31.3-q32; 4q35; 5q11.2-q21; 5q31; 5q34-q35; 6q16; 6q24-q25; 7p13; 7p15-p21; 7q21-q31; 8p11.2-p12; 8q11.2-q21.1; 8q23; 9p12-p13; 9p21-p23; 9q21-q34; 10p11.2-p15; 10q22; 11p11.2-p13; 11p15; 11q12-q13; 11q14-q25; 12p11.2-p13; 12q12-q13; 12q24.1-q24.2; 14q11.2-q21; 14q22-q23; 14q24; 15q15-q21; 15q23-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q13; 16q21-q24; 17p11.2-p12; 18p11.2; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 19q13.2-q13.3; 22q13; Xq12-q21	1p21; 1q41-q44; 2q37; 3p21; 3q13.3; 3q26.1; 4p14-p15.1; 4p15.3-p16; 4q12-q13; 5p15.3; 6p12-p21.1; 6p21.3-p22; 6p24-p25; 6q12; 6q27; 8p21-p22; 8p23; 8q24.3; 10q25; 12q13-q21; 17q24-q25; 18q12-q22; 19p13.2-p13.3; 20p11.2-p12; 20q11.2; 20q13.2-q13.3; 21q11.2-q22; Xp11.2-p21; Xp22.1-p22.3
ON		
ON1	1p32-p35; 1p36.2-p36.3; 1q24-q31; 1q42-q43; 2p13-p14; 2p16-p24; 2q14.3-q21; 2q24; 2q31-q32; 2q34; 3p12-p13; 3q13.3-q22; 3q24-q25; 3q26.3-q27; 4p15.2-p15.3; 4q34-q35; 5p12-p13; 5p14-p15.2; 5q21; 5q23; 5q32-q35; 6p22; 6q22; 7p21; 7q11.2; 8p11.2-p12; 8p22-p23; 8q23-q24.3; 9p13-p21; 9q21; 9q31-q33; 10p11.2-p12; 10q11.2-q21; 10q21; 10q22; 10q23-q26; 11p13; 11p15; 11q13-q14; 11q14-q23; 13q13-q31; 13q32-q33; 14q12; 14q13-q21; 14q23-q32; 15q13-q21; 16p11.2-p13.3; 16q21-q24; 18p11.2-p11.3; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13	1p12-p21; 1p22; 1p22-p31; 1q31-q32; 2p11.2; 2q11.2-q12; 2q22-q23; 2q32; 3p21; 3p21-p23; 3p24-p26; 3q23; 4p16; 5q11.2-q12; 5q14-q15; 6p11.2-p12; 6p12-p21.1; 6p24-p25; 6q12-q14; 6q16-q21; 6q22-q23; 6q25-q27; 7p11.2-p13; 7q11.2; 7q31; 8p21; 8q11.2-q13; 8q21.3-q22; 9p12-q21; 9q34; 11q12-q13; 11q24-q25; 12p11.2-p12; 12q13; 12q23-q24.1; 17p11.2; 17p12-p13; 17q11.2-q21; 17q22-q23; 18q11.2; 18q12-q21; 19q13.4; 20p12-p13; 20q11.2-q12; 20q13.1-q13.3; Xp11.2; Xp11.4-p22.3; Xq21; Xq21-q22
ON2	1p21-p22; 1p31; 1p31-p34.2; 1p35; 1p36.1-p36.3; 1q21; 1q24-q31; 1q41-q43; 2p13-p14; 2p24; 2q12-q13; 2q35-q37; 3p21; 3p24-p25; 3q23-q26.1; 3q26.3-q29; 4p12-p13; 4p14-p16; 4q12-q13; 4q22; 4q32-q35; 5p15.1-p15.3; 5q11.2-q13; 5q21; 5q31-q35; 6p22-p24; 6q15-q16; 6q24-q27; 7p11.2-p12; 7q11.2-q21; 7q31-q32; 7q33-q36; 8p11.2-p12; 8q11.2-q13; 8q21.1-q21.3; 8q22; 8q23-q24.3; 9p12; 9p13; 9q22-q34; 9q34; 10p11.2; 10p11.2-p15; 10q11.2-q21; 10q25-q26; 11p12-p13; 11q14; 11q22-q23; 11q24-q25; 12p12; 12q13-q15; 12q21; 12q23-q24.3; 13q12-q14; 13q21-q34; 14q31-q32; 15q12-q13; 15q22-q24; 15q25-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp21-p22.1; Xq21-q22; Xq23-q24; Xq26-q27; Xq28; Yp11.2; Yq11.2	2p16; 3q13.1; 5p14
TW		
TW5	1p12-p13; 1p32-p36.3; 1q21-q22; 1q23-q24; 1q32-q44; 2q11.2-q13; 2q14.3-q22; 3p22-p26; 3q13.1-q13.2; 3q22-q25; 4q31.1-q34; 5q12-q13; 6q16; 6q22-q27; 7q31; 7q36; 8p11.2-p12; 8q23-q24.3; 9p12-p21; 9p21; 10p14; 10q21-q22; 10q23-q24; 11q12-q13; 12q12-q13; 12q13-q21; 12q21-q24.3; 14q24-q31;	3p12-p14; 3q27-q28; 4q21-q22; 4q24-q26; 5q21-q23; 5q35; 6p24-p25; 7p12; 7p14; 7p15-p21; 7q11.2-q22; 9q21; 9q33-q34; 21q21; 21q22; 22q11.2-q12; Xp22.2-p22.3; Yp11.2-p11.3

	15q11.2-q13; 15q21-q23; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17p11.2-p12; 17q11.2-q25; 18p11.2; 18q11.2-q23; 19p13.2; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q12-q13.2; Xp11.4-p21	
TW8	1p12-p21; 1p22-p31; 1p34.2-p36.3; 1q21; 1q32-q44; 2p11.2-p13; 2p21; 2p23-p25; 2q12-q21; 2q22-q23; 2q24-q32; 2q34-q37; 3p12-p14; 3p21; 3p22-p25; 3q13.3; 3q22-q29; 4p12; 4p15.1-p16; 4q12-q21; 4q27; 4q31.1-q31.2; 4q32-q35; 5p13; 5p14-p15.1; 5q14; 5q21-q31; 5q31-q35; 6p12-p21.1; 6q16-q22; 6q24-q27; 7p12-p15; 7p21; 7q31-q36; 8q21.3; 8q22-q24.3; 9p12-p24; 9q13-q22; 9q31-q34; 10p13-p14; 10q21; 10q22-q23; 10q23-q26; 11p11.2-p14; 11p15; 11q14-q24; 12q13-q15; 12q21-q24.3; 13q12-q14; 13q21-q34; 14q12-q32; 15q14-q26; 16p11.2-p12; 16p12-p13.3; 16q12.1-q13; 16q21-q24; 17p12; 13p13; 17q11.2-q21; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.2; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2; Xp11.3-p22.2; Xq12-q21; Xq21-q25	6p24-p25; 7q11.2
TW10	1p21; 1p31-p36.3; 1q41; 2p12; 2p14-p16; 2p16-p25; 2q13-q14.3; 2q34-q37; 3p14-p25; 3q21-q23; 3q25; 3q26.1-q29; 4p15.3-p16; 4q31.2-q35; 5p15.1-p15.2; 5p15.3; 5q31-q35; 6p21.1-p22; 6p23; 6q24-q25; 6q27; 7p21-p22; 7q31-q36; 8p22-p24.3; 9p12-p23; 9q22-q34; 10p12-p14; 10q22-q26; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q15-q21; 12q21-q24.3; 14q31-q32; 15q21; 15q22-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q22; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xq26-q27	1q22-q23; 3p12; 3q13.1; 4p12-p13; 4q12-q21; 4q21-q26; 5q12-q13; 5q14-q22; 6q12-q23; 7p11.2; 7q11.2; 7q21; 9q21; 10q21; 11p12; 11p13-p14; 11q12; 12q12; 13q12; 13q13-q14; 13q14-q21; 13q21-q22; 13q34; 14q12-q22; Xp11.2; Xq13-q22; Yp11.2-p11.3
TW12	1p12-p22; 1p31-p34.2; 1q21-q25; 1q32-q44; 2p16-p24; 2q11.2-q32; 3p14-p21; 3q13.2-q29; 4p13-p16; 4q12-q24; 4q28-q31.3; 4q32-q33; 5p12-p13; 5q11.2-q21; 5q23-q35; 6p12; 6p21.2-p22; 6q15-q22; 7p12-p15; 7q21-q36; 8p11.2-p12; 8q12-q24.3; 9p12-p23; 9q21-q22; 9q31-q34; 10p11.2-p12; 10q11.2-q22; 10q25; 11p11.2-p14; 11p14-p15; 11q13-q25; 12p11.2; 12p12-p13; 12q12-q24.2; 13q14-q21; 14q21-q32; 15q12-q24; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17p11.2-p12; 17q11.2-q25; 18p11.3; 18q11.2-q22; 18q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p21; Xp21; Xq13-q26	4q35
TW13	1p32-p36.3; 1q21-q22; 1q31-q44; 2p13-p15; 2p21-p25; 2q35-q37; 3p14-p26; 3q21; 3q26.3-q27; 4p15.1-p16; 4q31.1-q35; 5p12-p15.3; 5q13-q14; 5q15-q21; 5q31; 5q32-q35; 6p12-p22; 6p23-p25; 6q16-q22; 6q23-q27; 7p12-p22; 7q22-q36; 8p12-p22; 8q23-q24.2; 9p12-p24; 9q13-q34; 10p11.2-p12; 10p13-p15; 10q21-q22; 10q23-q26; 11p12-p15; 11q22-q25; 12p11.2-p13; 12q13-q14; 12q21-q24.3; 13q31-q34; 14q22-q24; 14q31-q32; 15q12-q13; 15q21-q26;	1p21-p31; 2p12; 2q24-q31; 2q32-q33; 3q13.1-q13.3; 4q12-q13; 4q22-q23; 4q25-q28; 5q21; 7p11.2-p12; 7q11.2; 8p11.2; 11q12-q13; 13q21-q31; 14q11.2; Xq21

	16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q21-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp21; Xq22-q25; Xq25-q28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2	
TW14	1p12-p21; 1p31-p36.1; 1q21-q24; 1q24-q44; 2p12-p25; 2q11.2-q13; 2q14.1-q22; 2q24; 2q31; 2q35-q37; 3p14-p26; 3q13.3-q23; 3q24-q29; 4p15.3-p16; 4q33-q35; 5p14-p15.3; 5q11.2-q12; 5q13-q14; 5q23; 5q31-q35; 6p12-p25; 6q14-q26; 6q27; 7p12-p15; 7p21-p22; 7q22-q36; 8p11.2-p12; 8q22; 8q23-q24.3; 9p12-p23; 9q21-q34; 10p13-p15; 10q21; 10q22-q26; 11p12-p14; 11p14-p15; 11q13-q14; 11q22-q25; 12p11.2-p12; 12p12-p13; 12q13; 12q13-q14; 12q21-q24.3; 13q12; 13q31-q34; 14q11.2-q12; 14q21; 14q23-q32; 15q23-q24; 15q25-q26; 16p11.2; 16p12-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p22.1; Xq13-q21; Xq21-q22; Xq23-q28; Yp11.2; Yq11.2	1p22; 1p36.3; 4p12-p14; 4q12-q13; 4q21; 4q22-q26; 4q27-q28; 4q28-q31.3; 5p12-p13; 7q21; 7q21-q22; 8q21.1-q21.3; 11p11.2; 11q12-q13; 15q14
TW15	1p12-p31; 1p31-p36.3; 1q21-q23; 1q25-q44; 2p11.2-p24; 2q11.2-q37; 3p13-p26; 3q13.3-q24; 3q28-q29; 4p12-p13; 4p14-p16; 4q12; 4q13-q22; 4q24-q26; 4q26-q35; 5p12-p15.3; 5q11.2; 5q12-q13; 5q21-q23; 5q31-q35; 6p12-p21.2; 6p22-p25; 6q22; 6q22-q27; 7p12-p22; 7q11.2-q21; 7q22-q36; 8p11.2-p23; 8q12; 8q22-q24.3; 9p12-p24; 9q13-q34; 10p11.2-p15; 10q21-q26; 11p12-p13; 11p14-p15; 11q22-q25; 12p11.2-p13; 12q12-q14; 12q22-q24.3; 13q12-q13; 13q21; 13q21-q34; 14q11.2-q12; 14q13-q21; 14q22-q32; 15q14-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q12; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q12-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p11.3; Xp21; Xq22-q28; Yq11.2	11q12
TW16	1p13-p21; 1p22-p36.3; 1q21-q31; 1q31-q44; 2p11.2-p13; 2p16-p25; 2q11.2-q12; 2q24; 2q33-q37; 3p12-p26; 3q13.1-q29; 4p12-p16; 4q12-q25; 4q28-q35; 5p12-p15.3; 5q12-q14; 5q21-q22; 5q23; 5q31-q35; 6p12-p21.3; 6p22-p25; 6q16-q21; 6q22-q27; 7p11.2-p22; 7q11.2-q21; 7q22-q36; 8p11.2-p23; 8q21.1-q21.3; 8q21.3-q24.3; 9p12-p24; 9q21-q34; 10p11.2-p15; 10q11.2-q26; 11p11.2-p15; 11q12; 11q12-q25; 12p11.2-p13; 12q12-q24.3; 13q12-q21; 13q21-q34; 14q11.2-q32; 15q11.2-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p22.3; Xq12-q28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2	2q14.3-q21; 2q21; 2q21-q23; 2q31-q32; 5q15-q21; 8q11.2
TW17	1p12-p13; 1p13-p36.3; 1q21-q32; 1q32-q44; 2p11.2-p25; 2q12-q37; 3p12-p25; 3q13.3-q26.3; 4p12-p16; 4q21-q22; 4q24-q28; 4q31.2-q35; 5p12-p15.3; 5q11.2-q35; 6p12-p25; 6q12-q21; 6q24; 7p11.2-p12; 7p12-p21; 7q11.2-q21; 7q22-q32;	6q26-q27

	7q33-q36; 8p12-q21; 8q11.2-q12; 8q21.1-22; 8q24.1-q24.3; 9p13-p24; 9q22-q34; 10p11.2-p15; 10q21-q26; 11p11.2-p14; 11p14-p15; 11q12-q22; 11q22-q25; 12p11.2-p13; 12q12-q21; 12q22-q24.3; 13q12-q34; 14q12-q32; 15q12-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q12-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-19q13.4; 20p11.2; 20p12-p13; 20q13.1-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp21-p22.1; Xq12-q21; Xq21-q26; Xq27	
TW18	1p12-p21; 1p22-p36.3; 1q21-q23; 1q24-q44; 2p11.2-p12; 2p12-p13; 2p13-p25; 2q12-q23; 2q24-q37; 3p12-p26; 3q13.1-q29; 4p12-p16; 4q13-q21; 4q27; 4q28-q35; 5p12-p15.3; 5q11.2-q14; 5q21-q35; 6p21.1-p21.3; 6p22-p25; 6q22-q23; 6q24; 6q25-q27; 7p11.2-p22; 7q11.2; 7q21-q36; 8p21; 8q11.2-q12; 8q21.1-q24.3; 9p12-p13; 9p13-p24; 9q21-q34; 10p11.2-p15; 10q11.2-q26; 11p11.2-p15; 11q12-q25; 12p12-p13; 12q12-q24.3; 13q12-q34; 14q13-q32; 15q14-q21; 15q22-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p11.4; Xp21-p22.2; Xq12-q13; Xq21; Xq21-q28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2	6p1.2-p12; 6q12-q13; 6q14-q16
TW19	1p13-p21; 1p22-p35; 1q21-q24; 1q25-q32; 1q32-q41; 2p14; 2p23-p24; 2q14.1-q14.3; 2q22-q24; 2q33; 2q36-q37; 3p14; 3q21-q26.1; 3q27-q29; 4p13-p14; 4p15.1-p16; 4q12-q26; 4q31.1-q32; 4q34-q35; 5p14; 5q11.2-q12; 5q23-q35; 6p21.3-p23; 6q13-q14; 6q16-q22; 6q24; 7p11.2-p21; 7q11.2-q21; 7q22-q36; 8q11.2-q21.1; 8q21.3-q24.3; 9p21-p23; 9q21; 9q22-q34; 10p11.2; 10q11.2-q26; 11p12; 11q12-q14; 11q22-q25; 12q13-q24.3; 13q22-q31; 13q32-q33; 14q12-q32; 15q12-q21; 15q22-q26; 16p11.2-p13.2; 16q12.1-q21; 16q22-q24; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q21; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2; 20q13.1-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp11.2-p21; Xq27; Yp11.2; Yq11.2	3p25-p26; 5p15.3; 10p15; 13q14

(AP) Adenoma Pleomórfico; (CAC) Carcinoma Adenóide Cístico; (CDS) Carcinoma Ductal Salivar; (CEM) Carcinoma Epitelial- Mioepitelial; (CXAP) Carcinoma ex- Adenoma Pleomórfico; (ON) Oncocitoma; (TW) Tumor de Warthin.

ANEXO 5. Regiões mínimas comuns envolvidas em alterações genômicas (ganhos e perdas de DNA) identificadas por HR-CGH ($p < 0,05$) em cada uma das 17 amostras a fresco de TGS de diferentes tipos histológicos.

CASOS	PERDAS	GANHOS
ACAR		
ACAR1F	1q41; 2q32-q36; 3p12-p14; 3p21; 3p21-p24; 3q13.1; 3q21-q25; 3q25-q29; 4q32; 5p13-p15.3; 5q21; 5q31; 5q32-q34; 6q16-q22; 6q22-q23; 7q31; 7q33-q36; 8p12; 8q11.2-q12; 8q23; 9p13-p24; 9q31-q34; 11p14; 13q12-q13; 13q21-q22; 13q31; 13q32-q34; 14q22-q23; 15q14-q15; 15q25-q26; 16q22; 16q24; 18q12-q21; 18q22-q23; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; 22q13; Xq21-q22; Xq24-q26;	1p12-p13; 1p34.2-p34.3; 4p16
ACAR2F	1q41-q44; 2p21-p24; 2q34-q37; 2q37; 3p21-p25; 3q24-q25; 3q26.1-q29; 4p13-p15.3; 4q32-q33; 4q35; 6q21-q27; 7p21; 7q36; 8q24.3; 9p21-p24; 9q33-q34; 11q23; 12p12; 13q22-q33; 14q22-q32; 15q14-q26; 16q23-q24; 17p11.2-p13; 17q25; 18p11.2; 18q11.2-q22; 20p12; 20q12-q13.3; 21q21-q22; 22q12-q13; Xp21-p22.1; Xq24-q28; Yp11.2-p11.3	1p13; 1q21-q25; 2p11.2-p12; 2q11.2-q13; 3q13.3; 4q24-q26; 5q11.2-q13; 7q11.2
ACAR3F	2q32-q36; 3p21-p22; 3q26.1-q26.2; 4q31.3-q32; 5p14-p15.1; 6p22-p24; 6q12-q13; 6q14-q21; 8q21.3-q22; 9q21-q22; 9q34; 11p11.2-p15; 11q14-q22; 11q23; 12p12-p13; 12q12; 12q15-q21; 13q21-q31; 15q21-q22; 15q24-q26; 16q12.2-q24; 17p11.2-p12; 17q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 20p12-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; Xp21-p22.1; Xq25-q26	1p32-p36.1
AP		
AP2F	1p22; 1q41; 2p16-p21; 2q32-q37; 4p12; 4q13-q21; 4q26; 4q32; 5p12; 5p13-p15.2; 5q11.2-q13; 5q14-q31; 6q16-q22; 6q23-q24; 7q32-q35; 9p13-p21; 10q23; 11q23; 13q23; 13q21-q31; 14q21-q22; 14q21-q22; 14q24-q31; 16q13-q21; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 20q13.2; 21q21-q22; 22q11.2-q12	1p34.1-p35; 3p21; 4p16; 10p14-p15; 11p15
AP5F	2q31-q32; 2q34; 3p14; 3q24-q25; 3q26.1-q26.3; 3q28-q29; 4q13; 5p12-p14; 5p15.1; 5q12-q13; 5q23-q31; 6q16-q21; 6q23-q24; 7q21; 7q34-q36; 8p12-p21; 8q11.2-q13; 8q21.1-q23; 10q24; 11p11.2-p14; 12p11.2; 12q21-q22; 13q12-q14; 13q21-q22; 13q31; 14q11.2-q13; 14q21; 14q22-q31; 15q12-q21; 15q25-q26; 16q12.2-q24; 17p11.2; 18p11.2; 18q11.2-q23; 19q13.1; 20p11.2-p12; 20q13.2-q13.3; Xp11.2; Xq13-q21; Xq21-q22; Xq24-q27	1p13; 1p34.2-p35; 1q23-q24
AP7F	1q43; 3q28-q29; 4p13-p14; 4q32; 4q35; 6q12-q16; 7q36; 8q21.3-q22; 8q22-q23; 9p23-p24; 11q23-q25; 12p11.2-p13; 12q24.1-q24.3; 12q24.3; 13q12-q14; 13q22-q31; 13q33-q34; 16q22-q24; 18p11.2-p11.3; 20p12-p13; 20q12-q13.3; 22q11.2-q13	1p34.1-p34.3; 10q21; Xp11.2-p11.3
AP8F	1q43-q44; 2p16-p25; 2q34-q37; 3p21-p25; 3q27-q29; 4p14-p15.3; 4q32-q33;	1p13-p32; 1p33-p34.3; 1q21-q25; 2p11.2-p12; 2q11.2-q23; 2q24-q31; 3p12;

	4q34-q35; 5p14-p15.3; 5q32-q34; 5q35; 6q16-q21; 6q23-q27; 7p15-p22; 7q31-q36; 8p21-p23; 8q24.1-q24.3; 9q22-q34; 10q25-q26; 11q22-q25; 12q21-q24.3; 13q21-q34; 14q12-q21; 14q22-q32; 15q21-q24; 15q24-q26; 16q24; 17p12; 17q24-q25; 18q11.2-q23; 19q13.1-q13.2; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q22; 22q11.2-q13; Xp22.1-p22.2; Xq23-q28	3q13.1-q21; 3q23-q24; 4q12-q31.1; 5p12-p13; 5q11.2-q21; 6p11.2-p21.3; 6q12-q14; 7p12; 7q11.2; 8p11.2-p12; 8q11.2-q13; 8q21.3; 9p12-p13; 10p11.2-p12; 10q11.2-q21; 11p11.2-p13; 11q12-q13; 12p11.2-p12; 12q12-q14; 16p11.2; Xp11.2-p11.4; Xq12-q13
AP9F	1q31-q44; 2p21-p24; 2q31-q37; 3p22-p23; 3q26.3-q29; 4p13-p16; 4q31.3-q35; 5p14-p15.3; 5q32-q35; 6p22-p24; 6q22-q24; 6q25-q27; 7q31-q36; 8p12-p23; 8q22-q24.3; 9p21; 9p21-p24; 9q32-q34; 11p13-p15; 11q23-q25; 12p11.2; 12p12-p13; 12q15-q24.1; 13q21-q22; 13q32-q34; 14q32; 15q14-q26; 16q12.1-q22; 16q23-q24; 17q25; 18q11.2-q22; 19q13.1; 20p12; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xq21-q23; Xq25-q27	2p11.2-p12; 3q13.3; 3q21; 7q11.2; 8q12-q13; 10q11.2-q22; 11q23; 13q12-q13
CAC		
CAC1F	1p31-p32; 1p36.2-p36.3; 1q32-q44; 2p21-p23; 2q32-q37; 3q24-q29; 4p15.1-p15.3; 4q32; 5p14-p15.2; 5q31-q34; 6q22-q24; 6q24-q27; 7p15-p21; 7q31-q36; 8p12-p23; 8q23-q24.1; 9q33-q34; 10q23-q26; 11p14-p15; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q21-q24.2; 13q21-q33; 14q23-q32; 16p12-p13.1; 16q13-q24; 17p11.2-p12; 17q23-q25; 18q12-q23; 21q21-q22; 22q12; Xq25-q28; Yq11.2	1p13-p21; 1q21-q24; 2p11.2-p12; 2q11.2-q14.1; 3p12; 3q13.1-q13.3; 5q11.2-q12; 7q11.2; 11q12-q13
CAC2F	1p36.2; 1q32-q42; 1q42-q44; 2p16-p22; 2p23-p24; 2q34; 2q37; 3p22-p25; 3q26.1-q29; 4q32; 4q34-q35; 5p14-p15.1; 6q22-q23; 6q25-q27; 7q31-q36; 8q23; 9p23-p24; 9q22; 9q31; 9q33-q34; 12p12-p13; 12q15-q24.3; 13q21; 13q33; 15q21-q22; 15q24-q26; 16q22-q24; 17p11.2-p13; 17q24-q25; 18q11.2-q12; 18q21-q23; 19q13.2-q13.4; 20q13.3; 21q22; 22q13; Xp21-p22.1; Xq22-q23; Xq25-q27	1p12-p13; 1q21-q22; 2p11.2; 2q11.2-q24; 3q13.3; 4q21-q22; 4q24; 5q11.2; 5q13-q14; 7q11.2; 8p11.2-p12; 10p11.2; 10q21-q22
CAC3F	1q31; 1q32-q44; 2p16-p24; 2q31-q37; 3q24-q25; 3q26.1-q29; 4p13-p15.3; 4q31.2-q33; 4q35; 5p14-p15.3; 5q21-q23; 5q31-q35; 6p22-p23; 6q16-q27; 7p14-p15; 7q21-q36; 8q23; 9p21; 11p13-p15; 11q13-q25; 12q21-q24.1; 13q12-q14; 14q22-q31; 15q26; 16p12-p13.1; 16q12.2-q24; 17p11.2; 18p11.2; 18q11.2-q23; 19q13.1-q13.4; 20p12-p13; 20q11.2-q13.1; 21q21-q22; 22q11.2-q13; 22q13; Xp21-p22.3; Xq13-q23; Xq25-q28; Yp11.2	3p12; 3q13.3; 7q11.2
CAC4F	1p34.1-p36.3; 1q31; 1q31-q44; 2p15-p25; 2q34-q37; 2q37; 3p12-p13; 3p14-p25; 3q24-q25; 3q26.1-q29; 4p15.2-p16; 4q31.3-q35; 5p14-p15.3; 5q31-q34; 6p22-p25; 6q22-q27; 7p14-p22; 7q32-q36; 8p21-p23; 8q23-q24.2; 9p13-p24; 9q22-q34; 10p13-p14; 10q23-q26; 11p12-p14; 11p14-p15; 11q23-q25; 12q22-q23; 13q21-q31; 13q32-q34; 14q23-q32; 15q15; 15q21-q26; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 20p12-p13; 20q12-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp21; Xq22-q23; Xq24-q28; Yp11.2-p11.3; Yq11.2	1p12-p13; 1q21-q22; 2p11.2-p12; 2q11.2-q13; 4p12; 4q12-q28; 7q11.2-q21; 8q12-q21.1; 10q21

CAC5F	1q32-q44; 2p23; 2q32-q36; 2q37; 3p21-p23; 3q24-q25; 3q25-q27; 3q29; 4p14-p15.2; 4q31.2-q33; 4q35; 5p14-p15.3; 5q31-q35; 6p21.3-p22; 6p23-p24; 6q23-q27; 7p15-p21; 7q21-q36; 8p22; 8q23-q24.1; 8q24.2-q24.3; 9p12-p13; 9p21; 9p23-p24; 9q21-q34; 11p11.2-p15; 11q23; 11q25; 12q21; 12q23-q24.1; 13q12-q14; 13q21-q31; 13q33-q34; 14q22-q24; 14q32; 15q12-q21; 15q25-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q21; 16q23-q24; 17p11.2-p12; 17q21; 17q23-q24; 17q25; 18p11.2; 18q11.2-q22; 18q23; 20p12-p13; 20q11.2-q12; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xq24-q25; Xq28; Yq11.2	1q21-q22; 2q12-q14.1; 3q13.1-q21; 4q21-q22; 5q11.2-q13; 12q12-q13; Xq12-q13
CME		
CME1F	1q32-q42; 2q34-q37; 3q24; 3q26.1-q26.3; 3q29; 6p23-p24; 6q14-q27; 7q31-q36; 8q13; 8q23; 11p11.2; 11p13-p15; 11q23-q24; 12q21-q24.1; 12q24.3; 13q21-q22; 13q32-q34; 15q11.2-q13; 16q12.2-q21; 16q22-q24; 17q11.2-q12; 18p11.2; 18q11.2-q22; 19q13.1; 20q11.2-q12; 21q11.2-q22; 22q11.2-q13; Xq23-q28	3p12; 4p16; 10p14-p15
CME2F	1q32-q41; 1q43; 2p16-p24; 2q32; 2q34-q37; 3p22-p26; 3q25-q29; 4p14-p15.3; 4q31.3-q35; 5p14-p15.3; 5q33-q34; 6q23-q24; 6q25-q27; 7q22-q36; 8q23; 8q24.2-q24.3; 9q22-q34; 10q26; 11q23-q25; 12q24.2-q24.3; 13q12-q14; 13q21-q34; 14q12-q13; 14q24-q31; 14q32; 15q12-q22; 15q24-q26; 16q12.1-q24; 17q24-q25; 18p11.2; 18q11.2-q23; 19q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q11.3; 21q21-q22; 22q11.2-q12; 22q13; Yp11.2	1p12-p13; 1p31; 1q21-q22; 1q23-q31; 10q11.2-q22; 12q13-q14
CME3F	2p16-p21; 2p23; 2q32-q33; 3p12-p13; 3p21; 3q24-q29; 4q32-q35; 5p14-p15.2; 5q31-q35; 6q16-q21; 6q22-q23; 6q25-q27; 7q31; 7q34-q36; 8q21.3-q23; 9p21; 9p24; 11p12-p15; 12q14-q21; 13q21-q22; 13q31-q34; 14q21; 14q22-q24; 14q24-q31; 15q11.2-q12; 15q14-q26; 16p11.2; 16p12-p13.1; 16q12.2-q34; 17p11.2-p13; 17q11.2-q22; 17q23-q25; 18q11.2-q23; 20p11.2-p13; 20q12-q13.3; 12q21-q22; 22q11.2-q13; Xq21; Yp11.2-p11.3	1p31; 2p11.2
CME4F	2p22-p23; 2q32; 2q33-q37; 3q24; 3q26.1-q26.3; 3q28-q29; 4p12-p15.1; 4q12-q13; 4q22-q24; 4q26-q28; 4q28-q31.1; 4q32-q33; 4q34-q35; 6q16-q21; 6q23-q24; 7q36; 8q11.2-q12; 8q13-q21.1; 8q21.3-q22; 9q22-q31; 11p14; 11q23-q24; 13q21-q34; 18q21-q23; 21q21-q22; Xq25-q26	1p31; 1p33-p36.1; 1q23-q25; 6p21.1-p21.3; 10p11.2; 10q11.2-q21; 10q22-q23; 10q25-q26; 12q13; 15q22-q25

(ACAR) Adenocarcinoma; (AP) Adenoma Pleomórfico; (CAC) Carcinoma Adenóide Cístico; (CME) Carcinoma Mucoepidermóide.

ANEXO 6. Ganhos e perdas genômicas recorrentes detectados entre os 27 AP analisados e os genes candidatos mapeados nestas regiões com suas respectivas funções.

Alterações comuns (casos)	Genes candidatos e suas principais funções e/ou processos envolvidos
+1q23 (11)	<i>FASLG</i> - sinalização célula-célula; fator de necrose tumoral e regulação positiva da cascata I-kappaB kinase/NF-kappaB; <i>TNFSF18</i> - fator de necrose tumoral; interação entre linfócitos T e células endoteliais; <i>HDGF</i> - diferenciação e proliferação celular; <i>SELL</i> - receptor de adesão; <i>PBX1</i> - sobrevivência celular sobre o stress de citocinas
-1q32 (18)	<i>PKPI</i> - adesão celular; <i>KISS-1</i> - organização do citoesqueleto e suposto supressor metastático; <i>JARID1B</i> - modificação da cromatina e suposto supressor tumoral; <i>ELF3</i> - repressor transcricional
-1q41 (16)	<i>TGFB2</i> - suposto onco-supressor tumoral; <i>DUSP10</i> - regulação negativa da sinalização extracelular via <i>MKP3</i> ; <i>MIA3</i> - regulação negativa de adesão e migração celular
-2p21 (17)	<i>SOCS5</i> - regulação do crescimento celular; sinalização de vias mediadas por citocinas e sinalização intracelular; <i>ECAM</i> - adesão celular; <i>PRKCE</i> - regulação da apoptose
-2q32 (16)	<i>TMEFF2</i> - funções moleculares e suposto supressor tumoral; <i>STAT1</i> - transdução de sinal e ativação de caspases
-3p23 (14)	<i>SATB1</i> - remodelamento da cromatina e regulação da transcrição; <i>SMARCC1</i> - remodelamento da cromatina e regulação da transcrição
-4p15.1-p15.3 (14)	<i>KCNIP4</i> - transporte de íons; <i>QDPR</i> - participa de processos catabólicos de aminoácidos; <i>RBPJ</i> - recombinação do DNA e regulação negativa da transcrição; <i>ANAPC4</i> - ciclo celular e divisão celular
-5p12-p13 (14)	<i>FBXO4</i> - processos catabólicos e ubiquitinação de proteínas; <i>PRKAA1</i> - transdução de sinal e ativação de <i>MAPKs</i> ; <i>DAB2</i> - proliferação celular
-5p14 (18)	<i>PRLR</i> - transdução de sinal e ativação de células T; <i>CDH9</i> - adesão celular; <i>PRDM9</i> - modificação da cromatina e meiose
-5q13 (15)	<i>MAP1B</i> - formação de microtúbulos e interação com o supressor tumoral <i>p53</i> ; <i>RASAI</i> - cascata de sinalização intracelular; regulação negativa da adesão celular e da adesão da matriz extra-celular; <i>PIK3R1</i> - regulação da apoptose; regulação da adesão celular; regulação da migração celular e transdução de sinal
-6q16-q21 (16)	<i>TSG1</i> - candidato a supressor tumoral; <i>MED23</i> - regulação da transcrição e suposto supressor de metástase; <i>WISP3</i> - sinalização célula-célula; regulação do crescimento celular e suposto supressor tumoral
-6q24 (20)	<i>HYMAI</i> - regulação da expressão do transgene humano (<i>HYMAI/PLAGL1</i>); <i>SASH1</i> - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral
-6q25 (16)	<i>PLAGL1</i> - parada do ciclo celular; indução da apoptose e suposto supressor tumoral; <i>WTAP</i> - regulação do ciclo celular e processamento de RNA
+7q11.2 (11)	<i>TBL2</i> - processos biológicos e vias de sinalização intracelular; <i>FGL2</i> - transdução de sinal; indução da angiogênese e metástase tumoral via indução de citocinas
-7q31 (20)	<i>PPP1R3A</i> - processos metabólicos de carboidratos e glicogênios; <i>CAVI</i> - regulação

	negativa da cascata Ras-p42/44 MAP e suposto supressor tumoral; POT1 - manutenção dos telômeros
-7q34-q36 (16)	CASP2 - regulação da apoptose; AKR1B1 - suposto supressor tumoral; DNAJB6 - regulação negativa de caspases e retardo do crescimento tumoral
-8q24.1-q24.2 (17)	RAD21 - reparo de danos ao DNA; ciclo celular e divisão mitótica; KHDRBS3 - regulação da atividade da telomerase
-8q24.3 (14)	PARP10 - controle da proliferação celular via inibição de <i>c-Myc</i> ; NDRG1 - suposto papel na progressão tumoral via <i>p53</i>
-9p21 (16)	MTAP - participa de processos metabólicos de nucleotídeos; CDKN2A - parada do ciclo celular e suposto supressor tumoral; TOPORS - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral
-9q32-q34 (15)	DECI - regulação negativa do ciclo celular e da proliferação celular e suposto supressor tumoral; DBC1 - parada do ciclo celular; morte celular e regulação negativa do ciclo celular; TLR4 - participa da cascata I-kappaB kinase/NF-kappaB e da resposta imune; GSN - motilidade celular e regulação do citoesqueleto; DAB2IP - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral
+11q12 (11)	RAB1B - transporte protéico e transdução de sinal; MEDI9 - regulação da transcrição; PRPF19 - sobrevivência celular e reparo do DNA; TUT1 - controle expressão gênica e da proliferação celular; MARK2 - diferenciação celular; TNKS1BP1 - manutenção de telômeros; FEN1 - reparo do DNA
-11q23-q25 (17)	TAGLN - suposto papel na progressão tumoral; IL10RA - regulação negativa de expressão de <i>TMP-1</i> e inibição do crescimento tumoral; TRIM29 - promotor da transcrição de RNA pol II
-12p13 (14)	CDKN1B - parada do ciclo celular; regulação negativa da proliferação e do crescimento celular tumoral; CCND2 - transição G1-S do ciclo celular mitótico; divisão celular e regulação do ciclo celular; ING4 - apoptose; parada do ciclo celular; regulação negativa do ciclo celular e da proliferação celular e candidato a supressor tumoral
-12q21-q24.1 (20)	PAWR - regulação negativa da proliferação celular e suposto supressor tumoral; SOCS2 - supressor da tumorigênese; CRADD - regulação da apoptose e indução da morte celular; APAF1 - ativação de caspases; IKIP - papel pró-apoptótico via <i>p53</i> ; SART3 - processamento do RNA e função de antígeno de rejeição ao tumor; PRKAB1 - inibição do crescimento celular tumoral
-12q24.2-q24.3 (17)	HRK - regulação da apoptose e modulação da progressão tumoral; SUDS3 - modificação da cromatina e regulação da transcrição; NOS1 - neurotransmissão; atividade antimicrobial e antitumoral; KSR2 - cascata de sinalização intracelular; regulação negativa de via de sinalização NF-KappaB; SIRT4 - regulação de proteínas intracelulares com atividade mono-ADP-ribosiltransferase; HIP1R - participa de processos biológicos
-13q21-q22 (18)	PCDH8 - adesão celular e sinalização célula-célula; PCDH9 - adesão celular; EDNRB - participa de processos de sinalização de proteínas G e quimiotaxia de macrófagos; UCHL3 - regulação e ciclagem de ubiquitininas e regulação do ciclo celular

-14q24 (18)	MLH3 - reparo do DNA; ENTPD5 - função de hidralase e nucleotídeo fosfatase
-15q24 (15)	AKAP13 - processos biológicos e sinalização intracelular; BCL2AI - regulação da apoptose; SIN3A - regulação da transcrição; NEIL1 - reparo de excisão de bases e nucleotídeos e resposta a stress oxidativo
-16q22-q24 (18)	CDHI - adesão celular e papel de supressor tumoral; ZFH3 - repressor da transcrição e suposto supressor tumoral; WVOX - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral; OSGIN1 - diferenciação celular e inibição do crescimento celular tumoral; FBXO31 - suposto supressor tumoral
-17q25 (14)	EVPL - desenvolvimento da epiderme; queratinização e atividade de estrutura molecular; TIMP2 - regulação negativa da proliferação celular e regulação da cascata MAPKKK ; SOCS3 - anti-apoptose; cascata de sinalização intracelular; regulação negativa da diferenciação celular e do crescimento celular; SLC9A3R1 - candidato a supressor tumoral; CYGB - candidato a supressor tumoral
-19q13.1-13.2 (18)	CEBPA - sinalização de citocinas e diferenciação de células mielóides; SPINT2 - motilidade celular e suposto supressor tumoral; CEACAM5 - regulação da apoptose e suposto supressor metastático; CAPN12 - apoptose; divisão celular e modulação integrinas-citoesqueleto
-20p12 (18)	BFSPI - participa de processos biológicos; PAK7 - função anti-apoptótica
-20p13 (15)	ADAM33 - interação célula-célula e célula-matriz extracelular; FKBP1A - imunoregulação; AVP - sinalização célula-célula; transdução de sinal e vasoconstrição; CDC25B - regulação da divisão celular
-20q11.2-q12 (16)	RBL1 - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral; DSNI - participa de ciclo celular; divisão celular e segregação cromossômica
-20q13.1-q13.2 (17)	PTGIS - biossíntese de prostaglandinas; YWHAB - sinalização mitótica e regulação ciclo celular; TSHZ2 - regulação da transcrição; CDH22 - adesão celular; CEBPB - resposta imune e inflamatória
-22q13 (17)	CBX7 - regulação da transcrição; STI3 - candidato a supressor tumoral; SSTR3 - sinalização célula-célula; transdução de sinal e regulação negativa do ciclo celular; HDAC10 - modificação da cromatina e regulação da transcrição; FBLN1 - candidato a supressor tumoral; EP300 - apoptose; ciclo celular e suposto supressor do crescimento celular tumoral
-Xq22 (17)	ARMCX1 - manutenção dos tecidos e suposto supressor tumoral; TCEALI - regulação negativa da transcrição do promotor de RNA pol II; ESX1 - regulação do ciclo celular e da transcrição em células humanas
-Xq23-q25 (18)	PLS3 - reparo de danos ao DNA; CUL4B - reparo de danos ao DNA; participa do ciclo celular e de processos metabólicos

(-) perda da região; (+) ganho da região; entre parêntesis estão apresentados os número de casos em que a alteração foi detectada.

ANEXO 7. Alterações cromossômicas recorrentes detectadas entre os 11 TW analisados e os genes candidatos mapeados nestas regiões com suas respectivas funções.

Alterações comuns (casos)	Genes candidatos e suas principais funções e/ou processos envolvidos
-1p32-p34.3 (10)	<i>RAD54L</i> - suposto oncogene ou supressor tumoral dependendo do contexto e do tipo de tumor estudado; <i>CDKN2C</i> - parada do ciclo celular e suposto supressor tumoral; <i>ZFYVE9</i> - translocação nuclear de <i>SMAD</i> e participa da via de sinalização do <i>TGFBI</i> ; <i>FAFI</i> - participa de processos de morte celular programada; <i>LPTM5</i> - participa de processos de transporte; <i>HDAC1</i> - anti-apoptose e modificação da cromatina
-1q21 (10)	<i>TXNIP</i> - regulação do ciclo celular
-1q41 (11)	<i>TGFB2</i> - suposto oncogene ou supressor tumoral dependendo do contexto e do tipo de tumor estudado; <i>DUSP10</i> - regulação negativa da sinalização extracelular via <i>MKP3</i> ; <i>MIA3</i> - regulação negativa de adesão e migração celular
-2p24 (10)	<i>SMC6</i> - recombinação e reparo do DNA; <i>SDCI</i> - sinalização, proliferação e migração celular; <i>RHOB</i> - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral
-3p14 (10)	<i>FHIT</i> - replicação do DNA; processos metabólicos de nucleotídeos; regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral; <i>FOXPI</i> - regulação da transcrição e candidato a supressor tumoral; <i>ILI7RD</i> - proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular
-3q21-q25 (10)	<i>ATR</i> - <i>checkpoint</i> do ciclo celular requerido para a parada do ciclo celular e reparo de danos ao DNA; <i>RNF7</i> - função anti-apoptótica
-4p15.3-p16 (10)	<i>KCNIP4</i> - transporte de íons; <i>QDPR</i> - participa de processos metabólicos de aminoácidos; <i>HTRA3</i> - regulação do ciclo celular e suposto supressor tumoral; <i>MAEA</i> - adesão celular e regulação do ciclo celular
+4q22-q23 (4)	<i>MAPK10</i> - regulação da proliferação e diferenciação celular; regulação da transcrição e cascata <i>JNK</i> ; <i>SMARCADI</i> - regulação da transcrição; modificação da cromatina e processos metabólicos de nucleotídeos; <i>MMRNI</i> - adesão celular e coagulação sanguínea; <i>PDLIM5</i> - organização do citoesqueleto; especificação de linhagens celulares; interações célula-célula e suposto papel na oncogênese
+4q25 (4)	<i>EGF</i> - replicação do DNA; ativação das <i>MAPKKs</i> ; angiogênese e fator de crescimento epidermal; <i>CCNA2</i> - ciclo celular; divisão celular; mitose e proliferação celular tumoral
-4q31.2-q34 (10)	<i>FBXW7</i> - fator de transcrição e suposto supressor tumoral; <i>SFRP2</i> - diferenciação celular; <i>LRAT</i> - função de transferase; <i>CASP3</i> - fragmentação do DNA durante a apoptose e regulação da proliferação de células B e T; <i>HPGD</i> - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral
+5q21 (4)	<i>FER</i> - cascata de sinalização intracelular; fosforilação de proteínas; progressão do crescimento de células tumorais; <i>HSD17B4</i> - processos metabólicos de lipídeos; oxirredução e carreador de esteróides; <i>ST8SIA4</i> - glicosaminação de proteínas aminoácidas; processamento de N-glicans e processos metabólicos de oligossacarídeos
-5q31-q35 (10)	<i>CTNNA1</i> - adesão celular e regulação da apoptose; <i>TGFBI</i> - regulação negativa da adesão celular e proliferação celular; <i>IRF1</i> - regulação negativa do ciclo celular e participa da via do <i>TGFBI</i> ; <i>ABLIM3</i> - organização do citoesqueleto; <i>GABRP</i> - transporte de íons; <i>SLIT3</i> -

	diferenciação celular e participa da via de supressão da tumorigênese
+7q11.2 (4)	TBL2 - processos biológicos e vias de sinalização intracelular; FGL2 - transdução de sinal e indução da angiogênese e metástase tumoral via indução de citocinas
-7q33-q36 (10)	NDRG1 - suposto supressor metastático; CASP2 - regulação da apoptose; AKR1B1 - suposto supressor tumoral; DNAJB6 - regulação negativa de caspases e retardo do crescimento tumoral
-8q23-q24.3 (10)	RAD21 - reparo de danos ao DNA; ciclo celular e divisão mitótica; KHDRBS3 - regulação da atividade da telomerase
-9p12 (10)	SMUI - Participa de processos de supressão de <i>mec8</i> e homólogo <i>unc-52</i>
-9p21-p23 (10)	MTAP - participa de processos metabólicos de nucleotídeos; CDKN2A - inibição do ciclo celular; CDKN2B - suposto supressor tumoral; TOPORS - regulação negativa do ciclo celular e candidato a supressor tumoral; TUSC1 - suposto supressor tumoral; SH3GL2 - transdução de sinal e suposto supressor tumoral; PTPRD - sinalização de receptores transmembrana e suposto supressor tumoral
-9q22-q34 (10)	GADD45G - reparo do DNA e suposto supressor tumoral; TGFBRI - regulação do crescimento e proliferação celular e participa da via do <i>TGFB1</i> ; WNK2 - fosforilação de proteínas aminoácidas e regulação do crescimento celular tumoral
-10q22-q25 (10)	VCL - adesão celular; motilidade celular e regulação negativa da migração celular; NFKB2 - função pró-apoptótica e suposto supressor tumoral; DNMBP - participa da cascata de sinalização intracelular; TRIM8 - participa de processos biológicos e tem suposto papel de inibidor do crescimento tumoral; MXII - regulação negativa da proliferação celular e suposto supressor tumoral
+11q12 (4)	RAB1B - transporte protéico e transdução de sinal; MEDI9 - regulação da transcrição; PRPF19 - sobrevivência celular e reparo do DNA; TUT1 - controle expressão gênica e da proliferação celular; MARK2 - diferenciação celular; TNKS1BP1 - manutenção de telômeros; FEN1 - reparo do DNA
-11q23-q25 (10)	IL10RA - regulação da expressão de <i>TMP-1</i> , que tem papel na inibição do crescimento tumoral; TRIM29 - fator de transcrição; OPCML - adesão celular e suposto supressor tumoral
-12q13-q14 (10)	MYO1A - organização das projeções celulares e localização de vesículas; SMARCD1 - remodelamento da cromatina e regulação da transcrição; SMARCC2 - remodelamento da cromatina; fator de transcrição; LRPI - proliferação celular; endocitose e processos metabólicos de lipídeos
-12q21 (10)	PAWR - regulação negativa da proliferação celular e suposto supressor tumoral
-12q22-q24.2 (11)	SOCS2 - supressor da tumorigênese; CRADD - regulação da apoptose e indução da morte celular; APAF1 - ativação de caspases; IKIP - papel pró-apoptótico via p53; SART3 - processamento do RNA e função de antígeno de rejeição ao tumor; PRKAB1 - inibição do crescimento celular tumoral; HRK - regulação da apoptose e modulação da progressão tumoral; SUDS3 - modificação da cromatina e regulação da transcrição; NOS1 - neurotransmissão; atividade antimicrobiana e antitumoral; KSR2 - cascata de sinalização intracelular; regulação negativa de via de sinalização NF-KappaB
-12q24.3 (10)	SIRT4 - regulação de proteínas intracelulares com atividade mono-ADP-ribosiltransferase;

	<i>HIP1R</i> - participa de processos biológicos
-14q24-q32 (10)	<i>MLH3</i> - reparo do DNA; <i>ENTPD5</i> - função de hidrolase e nucleotídeo fosfatase; <i>SERPINA4</i> - inibição do crescimento celular; <i>DICER1</i> - processamento de RNAi
-15q22-q24 (10)	<i>MAP2K1</i> - regulação da proliferação de células tumorais; está envolvido na via do <i>TGFβ1</i> , atuando na ativação das <i>ERKs</i>
-16p11.2- p13.3 (10)	<i>HS3ST2</i> - atividade de transferase e sulfotransferase; <i>ARHGAP17</i> - transdução de sinal e atua nas junções celulares; <i>RBBP6</i> - supressor da proliferação celular; <i>METTL9</i> - proliferação celular; <i>GSPT1</i> - transição G1-S do ciclo celular; <i>ICAM5</i> - adesão célula-célula; <i>ADAMTS10</i> - funções moleculares; <i>CREBBP</i> - regulação da progressão do ciclo celular e participa da via do <i>TGFβ1</i> ; <i>AXINI</i> - regulação negativa da via de sinalização de <i>WNT1</i> e indução de apoptose
-16q12.1-q24 (11)	<i>CIAPIN1</i> - regulação da apoptose e inibição da proliferação celular tumoral; <i>E2F4</i> - oncogene ou supressor tumoral dependendo do contexto e tipo de tumor estudado; <i>CTCF</i> - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral; <i>CDH1</i> - molécula de adesão que atua como supressor tumoral; <i>ZFH3</i> - repressor da transcrição e suposto supressor tumoral; <i>WWOX</i> - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral; <i>OSGIN1</i> - diferenciação celular e inibição do crescimento celular tumoral; <i>FBXO31</i> - suposto supressor tumoral
-17p11.2-p12 (10)	<i>MAP2K4</i> - cascata <i>JNK</i> e transdução de sinal; <i>LLGL1</i> - manutenção da polaridade celular; <i>ADORA2B</i> - cascata <i>JNK</i> ; ativação da atividade de <i>MAPK</i> ; resposta de defesa celular e inibição do crescimento celular tumoral
-17q11.2-q25 (11)	<i>RAMP2</i> - transporte de proteínas; <i>PCGF2</i> - regulação negativa da transcrição e apoptose e suposto supressor tumoral; <i>PPP1R1B</i> - transdução de sinal e transcrição e suposto supressor tumoral; <i>BRCA1</i> - reparo do DNA e checkpoint do ciclo celular; <i>MAP3K14</i> - fosforilação de proteínas aminoácidas; <i>NME1</i> - supressor metastático; <i>AXIN2</i> - regulação negativa da proliferação celular e da via de sinalização do receptor <i>WNT</i> ; <i>PRKARIA</i> - transdução de sinal; regulação da transcrição e suposto supressor tumoral; <i>GNAI3</i> - migração e motilidade celular; <i>TIMP2</i> - regulação negativa da proliferação celular e regulação da cascata <i>MAPKKK</i> ; <i>SOCS3</i> - anti-apoptose; cascata de sinalização intracelular; regulação negativa da diferenciação celular e do crescimento celular; <i>SLC9A3R1</i> - candidato a supressor tumoral; <i>CYGB</i> - candidato a supressor tumoral
-18p11.2- p11.3 (11)	<i>IMPA2</i> - transdução de sinal; <i>TGIF1</i> - corepressor da transcrição e fator de transcrição
-18q12-q23 (10)	<i>CDH19</i> - caderina de adesão que deletada contribui para a invasão tumoral; <i>SMAD4</i> - inibição do ciclo celular; <i>SERPINB5</i> - motilidade celular; <i>DCC</i> - regulação negativa do ciclo celular e suposto supressor tumoral; <i>CDH19</i> - adesão celular e invasão tumoral; <i>PARD6G</i> - ciclo celular e divisão celular
-19p13.1- p13.3 (10)	<i>COL5A3</i> - adesão celular e adesão da matriz extracelular; <i>PRKACA</i> - molécula cAMP importante numa variedade de funções celulares; <i>CASPI4</i> - função apoptótica; <i>TNFSF9</i> - apoptose; proliferação celular e sinalização célula-célula; <i>MATK</i> - transdução de sinal e regulação da proliferação celular; <i>STK11</i> - ciclo celular e regulação negativa da proliferação

	celular
-19q13.1-q13.4 (11)	CEBPA - participa de vias de sinalização mediadas por citocinas; SPINT2 - motilidade celular; CEACAM5 - regulação da apoptose; TGFBI - controle da diferenciação e proliferação celular; CAPN12 - apoptose, divisão celular, interações da modulação integrinas-citoesqueleto e plasticidade sináptica; DPF1 - indução da apoptose; regulação da transcrição dependente de DNA e transcrição; FCGRT - resposta imune; ERCC2 - reparo a danos do DNA; SUPT5H - ciclo celular e remodelamento da cromatina
-20p11.2-p13 (11)	BFSPI - constituinte do citoesqueleto e participa de processos biológicos; PAK7 - função anti-apoptótica; FKBP1A - receptor de TGFBI e regulação negativa do crescimento tumoral; ADAM33 - interação célula-célula e célula-matriz extracelular; FKBP1A - imunoregulação; AVP - sinalização célula-célula; transdução de sinal e vasoconstricção; CDC25B - regulação da divisão celular
-20q13.1-q13.3 (10)	PTGIS - biossíntese de prostaglandinas; OGFR - regulação do crescimento celular; PMEPA1 - participa da via de sinalização de andrógenos; GATA5 - regulação da transcrição
-21q22 (10)	TFF2 - participa de processos de digestão; RUNX1 - suposto supressor tumoral; TMPRSS2 - função de peptidase
-22q11.2-q13 (10)	MED15 - regulação da transcrição e candidato a supressor tumoral; SMARCB1 - regulação da transcrição; regulação negativa do ciclo celular e candidato a supressor tumoral; TIMP3 - inibição do crescimento tumoral e metástase; NF2 - regulação negativa da adesão célula-célula e célula-matriz e suposto supressor tumoral; XBPI - resposta imune e regulação da transcrição; SEC14L2 - regulação da transcrição; DRGI - candidato a supressor metastático; CBX7 - regulação da transcrição; STI3 - candidato a supressor tumoral; SSTR3 - sinalização célula-célula; transdução de sinal e regulação negativa do ciclo celular; HDAC10 - modificação da cromatina e regulação da transcrição; FBLN1 - candidato a supressor tumoral; EP300 - apoptose; ciclo celular e suposto supressor do crescimento celular tumoral

(-) perda da região; (+) ganho da região; entre parêntesis está incluído o número de casos em que a alteração foi observada.

