UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GRAZIELA DE MOURA AGUIAR

**Avaliação do papel do gene *HOXC13* na regulação da
proliferação e migração celular em câncer de cabeça e
pescoço.**

Ribeirão Preto

2020

GRAZIELA DE MOURA AGUIAR

**Avaliação do papel do gene *HOXC13* na regulação da
proliferação e migração celular em câncer de cabeça e
pescoço.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Diferenciação
Celular Normal e Neoplásicas

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva
Jr.

Versão corrigida. A versão original
encontra-se disponível tanto na Biblioteca
da Unidade que aloja o Programa, quanto
na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)".

Ribeirão Preto
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Aguiar, Graziela de Moura

Avaliação do papel do gene *HOXC13* na regulação da proliferação e migração celular em câncer de cabeça e pescoço, 2020.

95 p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Diferenciação Celular normal e Neoplásicas.

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo

1 *HOXC13*; 2 Câncer de Cabeça e Pescoço; 3. Genes alvos

Nome: AGUIAR, Graziela de Moura

Título: Avaliação do papel do gene *HOXC13* na regulação da proliferação e migração celular em câncer de cabeça e pescoço.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásicas

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Membro do programa

Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro da USP

Instituição: FMRP– USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro externo a USP

Instituição: FCFRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A mim mesma, pela minha dedicação e esforço
durante todos esses anos na pesquisa!

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, que tudo rege no Universo e sempre nos guia pelo melhor caminho, desde que aceitamos ser guiados por sua Luz!

Sou grata a minha família, por todo o suporte, amor e cuidado! Amo vocês todos!

Sou grata ao meu noivo, amigo e confidente, André, por estar ao meu lado e por permitir que eu esteja ao seu lado nessa jornada que é a vida. Te amo sempre!

Sou grata a todos os meus amigos, em especial as minhas amigas Natália, Rafaela e Sarah. A amizade e companheirismo de todos vocês são um presente do Universo em minha vida!

Sou grata ao meu orientador, Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva, que ao longo desses quase 7 anos de parceria, sempre confiou na minha capacidade de executar meu projeto de Iniciação Científica e agora de Mestrado, com muita liberdade. Obrigada pela oportunidade de me desenvolver e crescer!

Sou grata ao meu co-orientador, Felipe Freitas de Castro, por toda a ajuda e apoio, não somente na execução deste trabalho, mas em todos os momentos que precisei. Você é uma pessoa maravilhosa e um amigo!

Sou grata a todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, por todo o apoio e ajuda, pelas risadas e boa convivência ao longo de todos esses anos. Sempre me lembrarei com carinho de todos!

Sou grata pela oportunidade de ter desenvolvido meus projetos na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, local que me proporcionou toda a infraestrutura, auxílio administrativo e financeiro que precisei.

Sou grata a Universidade de São Paulo (USP), em especial ao Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), por todo o conhecimento e experiência adquiridos ao longo da minha pós-graduação.

Sou grata aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) / CEPID - Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão – nº processo 2013/08135-2 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E sou grata a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

AGUIAR, Graziela de Moura. **Avaliação do papel do gene *HOXC13* na regulação da proliferação e migração celular em câncer de cabeça e pescoço.** 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os genes *HOX* constituem um subgrupo da família Homeobox, que se caracterizam pelo alto grau de conservação entre organismos. Em mamíferos há 39 genes *HOX* que exercem papel importante no desenvolvimento embrionário e tecidos adultos normais, regulando processos biológicos como proliferação, diferenciação, migração, angiogênese e apoptose. Estudos apontam que os membros desta família podem exercer papel importante durante a carcinogênese de vários tipos de cânceres, recapitulando a regulação dos processos iguais aos do desenvolvimento embrionário. Em um estudo anterior do nosso grupo, realizado *in vitro*, mostramos que o *HOXC13* regula a migração e a proliferação de linhagens de câncer de cabeça e pescoço. Posteriormente, identificamos por análise *in silico* aproximadamente mil possíveis genes alvos de regulação do *HOXC13*, sendo parte deles, enriquecidos em vias gênicas de interesse do grupo, que incluem as vias de migração e proliferação celular, bem como a via de transição epitelial-mesenquimal. Neste trabalho, sugerimos que o *HOXC13* desempenha um papel importante na progressão do câncer de cabeça e pescoço através da regulação positiva de processos biológicos centrais da proliferação celular, como o ciclo celular e a via de sinalização PI3K-Akt-mTOR, pela regulação direta e/ou indireta de genes alvos, assim como de outras vias biológicas envolvidas no mecanismo de EMT, como por exemplo a via do receptor de TGF- β .

Palavras-chave: *HOXC13*; câncer de cabeça e pescoço; genes alvos.

ABSTRACT

AGUIAR, Graziela de Moura. **Evaluation of the role of the *HOXC13* gene in the regulation of cell proliferation and migration in head and neck squamous cell carcinoma**. 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

HOX genes are a subgroup of the Homeobox family, which are characterized by a high degree of conservation between organisms. In mammals there are 39 HOX genes that play an important role in embryonic development and normal adult tissues, regulating biological processes such as proliferation, differentiation, migration, angiogenesis, and apoptosis. Studies point out that the members of this family can play an important role during the carcinogenesis of several types of cancers, recapitulating the regulation of the same processes as those of embryonic development. In a previous study by our group, conducted in vitro, we showed that HOXC13 regulates the migration and proliferation of head and neck cancer cell lines. Subsequently, we identified approximately 1,000 possible target genes for regulation of HOXC13 by in silico analysis, part of which were enriched in gene pathways of interest to the group, which include migration and cell proliferation pathways, as well as the epithelial-mesenchymal transition pathway. In this work, we suggest that HOXC13 plays an important role in the progression of head and neck cancer through the positive regulation of central biological processes of cell proliferation, such as the cell cycle and the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway, by direct and/or indirect target genes, as well as other biological pathways involved in the EMT mechanism, such as the TGF- β receptor pathway.

Keywords: HOXC13; head and neck squamous cell carcinoma; target genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões do câncer de cabeça e pescoço.....	19
Figura 2. Alterações genéticas no câncer de cabeça e pescoço.....	21
Figura 3. Colinearidade espacial e temporal dos genes <i>HOX</i>	22
Figura 4. Resumo dos resultados obtidos por Bueno & Ramão et al. (2016).....	25
Figura 5. Genes <i>HOX</i> diferencialmente expressos em câncer de cabeça e pescoço.....	26
Figura 6. O silenciamento dos genes <i>HOXC9</i> , <i>HOXC10</i> e <i>HOXC13</i> reduz a mobilidade celular e formação de colônias.....	27
Figura 7. Vetor <i>pGEM-T® easy</i> mostrando os sítios de restrição presentes.....	36
Figura 8. Mapa do vetor de expressão pOZ-FH-C utilizado nas clonagens de superexpressão do <i>HOXC13</i>	37
Figura 9. Silenciamento transiente da expressão do gene <i>HOXC13</i>	44
Figura 10. Redução da expressão do <i>HOXC13</i> induz a parada do ciclo celular.....	45
Figura 11. Redução da expressão do marcador de ciclo celular, Ciclina D1, após silenciamento do <i>HOXC13</i>	45
Figura 12. Redução da expressão do <i>HOXC13</i> regula o processo de transição epitelial-mesenquimal.....	46
Figura 13. Os genes alvos preditos do <i>HOXC13</i> , com correlação positiva, estão envolvidos com as vias de proliferação celular e transição epitélio-mesenquimal.....	47
Figura 14. Expressão do gene <i>HOXC13</i> na linhagem de HaCat.....	49

Figura 15. Superexpressão da proteína HOXC13-HA.....	50
Figura 16. Fragmentação da cromatina - <i>SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit</i>	51
Figura 17. Fragmentação da cromatina - <i>EZ – Magna ChIP G kit</i>	52
Figuras 18-25. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.....	53 a 56
Figura 26. Validação da correlação de expressão do gene <i>ALKBH8</i> e <i>HOXC13</i>	58
Figura 27. Validação da correlação de expressão do gene <i>ARHGEF18</i> e <i>HOXC13</i>	58
Figura 28. Validação da correlação de expressão do gene <i>EIF4B</i> e <i>HOXC13</i>	59
Figura 29. Validação da correlação de expressão do gene <i>LAMA3</i> e <i>HOXC13</i>	59
Figura 30. Validação da correlação de expressão do gene <i>PARD3</i> e <i>HOXC13</i>	60
Figura 31. Validação da correlação de expressão do gene <i>PFDN1</i> e <i>HOXC13</i>	60
Figura 32. Validação da correlação de expressão do gene <i>PIK3CD</i> e <i>HOXC13</i>	61
Figura 33. Validação da correlação de expressão do gene <i>TJP1</i> e <i>HOXC13</i>	61
Figura 34. Validação dos genes alvos preditos de HOXC13 envolvidos no processo de EMT.....	62
Figura 35. Vias sugeridas de atuação dos genes alvos do HOXC13 na EMT.....	67

Figura 36. **Via sugerida de atuação dos genes alvos do HOXC13 na proliferação celular.....69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação de genes marcadores do ciclo celular e EMT.....	31
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> para superexpressão do HOXC13-HA.....	31
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação da região promotora dos genes alvos preditos.....	31
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação dos genes alvos preditos selecionados (expressão).....	33
Tabela 5. Genes alvos preditos selecionados para os ensaios de ChIP-qPCR.....	48
Tabela 6. Vias de processos biológicos enriquecidas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
ALKBH8	<i>Alkylation repair homolog 8</i>
aPKC	<i>Atypical protein kinase C</i>
ARHGEF18	<i>Rho/rac guanine nucleotide exchange factor 18</i>
CASP3	<i>Caspase 3</i>
CASP8	<i>Caspase 8</i>
CCEL	Carcinoma de células escamosas da laringe
CDH1	E-caderina
CDKN2A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
cDNA	DNA complementar
CDS	Região codificadora do gene
ChIP	Imunoprecipitação da cromatina
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto
c-MET	<i>Tyrosine-protein kinase Met</i>
CO₂	Dióxido de carbono
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTRL	Controle
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados ou trifosfato de nucleosídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP	Proteína verde fluorescente
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EIF4B	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4B
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
ENV	Envelope viral
esiRNA	<i>Endoribonuclease-small interfering RNA</i>

FAT1	<i>FAT atypical cadherin 1</i>
FDR	<i>False discovery rate correction</i>
G0	Fase do ciclo celular onde a célula permanece indefinidamente na interfase
G1	Período no ciclo celular durante a interfase, após citocinese e antes da fase S
GAG	Capsídeo viral
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSAT	<i>Gene set analysis Toolkit</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HA	Hemaglutinina
HOX	Homeobox
HPV	Papilomavírus humano
HRAS	Proteína transformadora p21
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IMC	Índice de massa corporal
IP	Imunoprecipitação
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
lacZ	<i>β-galactosidase</i>
LAMA3	Subunidade alfa-3 da laminina
LB	Caldo de lisogenia
lncRNA	RNA longo não-codificador
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
MSigDB	<i>Molecular signatures database</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MYH10	<i>Myosin-10</i>
PARD3	<i>Par-3 family cell polarity regulator</i>
PARD6	<i>Par-6 family cell polarity regulator</i>
pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PDK1	Proteína quinase-1 dependente de proteína 3-fosfoinositida
PEI	<i>Polyethylenimine hydrochloride</i>
PFDN1	<i>Prefoldin subunit 1</i>
pH	Potencial hidrogeniônico de uma solução
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIK3CD	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta</i>
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
POL	<i>DNA polymerase</i>
PRKCA	Proteína quinase C alfa
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	<i>Ribonuclease</i>
ROCK	<i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1</i>
RT	Transcriptase reversa
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa quantitativa
S6K	Proteína ribossômica S6 quinase beta-1
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
Seq	Sequenciamento
SFB	Soro fetal bovino
SMURF1	<i>Smad specific e3 ubiquitin protein ligase 1</i>
SNAI2	<i>Snail family transcriptional repressor 2</i>
SYBR	Corante de cianina
Tag	Etiqueta proteica
Taq	DNA polimerase termoestável
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>

TGFB1	Fator de crescimento transformador beta 1
TGFBR1	Receptor beta do fator de crescimento transformador 1
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TJP1	<i>Tight junction protein 1</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
Tsc2	Complexo 2 da esclerose tuberosa
TTB	<i>Top tip bio</i>
TWIST1	<i>Twist family bhlh transcription factor 1</i>
UCSC	Universidade da Califórnia em Santa Cruz
USP	Universidade de São Paulo
VIM	Vimentina
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço.....	19
1.2. Genes <i>HOX</i>	21
1.3. Gene <i>HOX</i> e Câncer.....	23
1.4. Resultados obtidos pelo grupo sobre genes <i>HOX</i> na tumorigênese do câncer de cabeça e pescoço.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Aspectos éticos e biossegurança.....	30
3.2. Análise de vias enriquecidas.....	30
3.3. Customização de <i>primers</i>	30
3.4. Manutenção e expansão das linhagens.....	33
3.5. Extração de RNA.....	34
3.6. Síntese de cDNA.....	34
3.7. Análise dos níveis de expressão por meio de PCR em tempo real (RT- qPCR).....	34
3.8. Ciclo Celular.....	34
3.9. Construção dos vetores de expressão.....	35
3.9.1. Subclonagem no vetor de clonagem pGem.....	35
3.9.2. Clonagem no vetor de expressão pOZ-FH-C.....	36
3.10. Produção de retrovírus	37
3.11. Transdução retroviral nas linhagens FaDu e UMSCC-1	38
3.12. Análise da expressão da proteína HOXC13-HA após a transdução	38
3.13. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP).....	39
3.14. Amplificação dos genes alvos por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	41
3.15. Silenciamento gênico transiente e análise de correlação de expressão.....	42
3.16. Análises estatísticas	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Silenciamento do gene <i>HOXC13</i> leva a parada do ciclo celular e inibe o processo de EMT	44
4.2. Seleção dos genes alvos preditos e análise de vias enriquecidas.....	46
4.3. Análise da expressão da proteína HOXC13 fusionada a tag HA.....	49

4.4. Identificação dos genes alvos regulados por HOXC13 utilizando a técnica de ChIP-qPCR	50
4.4.1. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP).....	50
4.4.2. Amplificação dos genes alvos por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	52
4.5. Validação da correlação de expressão entre os genes alvos selecionados e o gene <i>HOXC13</i>	57
4.6. Análise de enriquecimento de processos biológicos.....	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	73
8. REFERÊNCIAS DA TABELA 5.....	81
9. APÊNDICE A.....	84
9.1. Resultado da imunoprecipitação da cromatina na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.....	84
10. APÊNDICE B	88
10.1. Resultado da imunoprecipitação da cromatina na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOXC13-HA.	88
11. ANEXO	93
11.1. Parecer da Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto	93
11.2... Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço

Cânceres que ocorrem na região da cabeça e do pescoço são coletivamente chamados de câncer de cabeça e pescoço. Eles têm como característica comum iniciar nas células escamosas dessas regiões, denominando-se assim, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço [1].

O câncer de cabeça e pescoço é subdividido de acordo com a região de ocorrência, conforme ilustrado na figura 1:

Figura 1. **Regiões do câncer de cabeça e pescoço.** Fonte: Adaptado de *NCI Head and Neck Cancer Homepage*.

O câncer de cabeça e pescoço é o sétimo mais comum no mundo e de acordo com a estimativa feita pelo Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, para cada ano do triênio 2020-22, é esperado 11.180 novos casos em homens e 4.010 para mulheres. Os homens são mais afetados, comparado às mulheres, com uma taxa de 3:1. Sua ocorrência é mais comum em países de baixo e médio desenvolvimento, sendo registrado aproximadamente 75% dos casos de mortes nesses países no ano de 2018 [2,3].

A cavidade oral e a faringe são as regiões com maior frequência de desenvolvimento do câncer. Somente a cavidade oral corresponde acerca de 50% dos casos. Os principais fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço são o tabagismo e etilismo, variando de acordo com o tipo específico do câncer, o sexo e a idade. Além disso há outros fatores de risco conhecidos ou potenciais, como a presença do papilomavírus humano (HPV), o alto índice de massa corporal (IMC) e a história familiar de câncer de cabeça e pescoço [2].

Alterações moleculares no câncer de cabeça e pescoço vêm sendo estudadas de forma crescente, mostrando diferenças genéticas entre cânceres HPV-positivo e HPV-negativo [2].

Tumores HPV-positivos possuem alterações genéticas particulares como perda do braço longo do cromossomo 16 (16q), diferenciação de queratinócitos e processo de estresse oxidativo, indicando aumento no número de cópias do braço longo do cromossomo 3 (3q), e mutação no oncogene *PIK3CA* [2].

Já tumores HPV-negativos possuem alterações genéticas relacionadas ao perfil de causa. Por exemplo, tumores desenvolvidos pelo fator envelhecimento possuem mutações em genes como *TP53*, *HRAS* e *CASP8*, enquanto aqueles relacionados ao tabagismo, possuem mutações em genes como *NPE2L2*, *TP53*, e em outros genes relacionados às vias de ciclo celular [2].

Outras anormalidades, como ganho ou perda em determinados cromossomos também já foram descritas, bem como ativação de oncogenes, como *Ciclina D1*, *MYC*, *EGFR* e inativação de genes supressores tumorais, como o *CDKN2A*, *FAT1* e *NOTCH1* [4]. A figura 2 exemplifica algumas dessas alterações citadas. Mas vale

lembrar que é o acúmulo, e não necessariamente a ordem dessas alterações genéticas, que determinam a progressão do câncer.

Figura 2. **Alterações genéticas no câncer de cabeça e pescoço.** Fonte: Adaptado de Hashibe *et al.* 2009.

A heterogeneidade tumoral é um dos principais fatores da ineficiência de tratamentos, como a rádio e a quimioterapia. As diferentes alterações moleculares, bem como a presença de células com características tronco-tumoral são algumas explicações para esse problema. Uma maior compreensão da biologia celular e molecular desses tipos de câncer facilitará o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. O monitoramento de biomarcadores é uma tentativa de diagnosticar, não somente o câncer de cabeça e pescoço, como muitos outros tumores em estágios iniciais e assim aumentar as chances de cura dos pacientes [5].

1.2. Genes *HOX*

Os primeiros estudos com os genes *HOX* foram realizados na década de 20 por Bridges e Morgan após análise do efeito de mutações em genes da mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*. Os pesquisadores observaram que as *Drosophilas* mutantes apresentavam alterações na estrutura corpórea e no desenvolvimento, que incluíam a substituição de antenas por patas, sugerindo a existência de genes responsáveis pelo desenvolvimento canônico das moscas do gênero *Drosophila* [6]. Os genes *HOX* compõem uma família de genes que atuam durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados e invertebrados regulando a diferenciação de órgãos e tecidos [7]. Nos vertebrados, os genes *HOX* estão organizados em famílias ou *clusters* gênicos, onde o número de membros de cada *cluster* varia de acordo com a

complexidade anatômica dos organismos. Em mamíferos, os genes *HOX* se subdividem em 4 clusters, denominados de *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*, localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2, respectivamente [8, 9]. Até o presente momento já foram identificados 39 genes *HOX* [10]. Assim como outros genes da superfamília Homeobox, os genes *HOX* codificam fatores de transcrição, que se caracterizam por possuírem um domínio de ligação ao DNA chamado de homeodomínio [11].

Há três mecanismos pelos quais os genes *HOX* são regulados durante o desenvolvimento canônico [Fig. 3]:

1. Os genes *HOX* são expressos seguindo a orientação dos genes na posição 3' para 5' ao longo do eixo ântero-posterior do organismo, sendo este tipo de regulação denominada de colinearidade espacial;
2. Os genes *HOX*, que estão posicionados mais a 5' terão um fenótipo dominante em relação aos genes posicionados a 3' dos complexos gênicos *HOX*, sendo descrito como prevalência posterior [12], e;
3. Os genes *HOX* são expressos temporalmente seguindo a ordem posicional de 3' para 5', ou seja, os genes com menor numeração estão na posição 3'. Por exemplo, o gene *HOXA1*, é ativado mais cedo em relação ao gene *HOXA13*. Este padrão de expressão é denominado colinearidade temporal [13].

Figura 3. **Colinearidade espacial e temporal dos genes *HOX***. O complexo gênico *HOX* é homólogo em humanos e *Drosophila*. Fonte: Goodman *et al.* 2003.

Os genes *HOX* são considerados os mais conservados da superfamília Homeobox, ao longo do processo evolutivo das espécies. Uma das suas funções mais marcantes consiste na formação do eixo ântero-posterior, atuando na diferenciação de tipos celulares, tecidos e órgãos, localizados nessa região. Além disso, eles regulam vários processos biológicos como proliferação, migração, adesão e morte celular, de acordo com o molde morfológico a ser desenvolvido [15].

1.3. Genes *HOX* e Câncer

Diversos estudos vêm mostrando que a perda do controle da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário acarreta o surgimento do câncer [16, 17]. Evidência da desregulação da expressão dos genes *HOX* em diferentes tumores vem sendo demonstrada em muitos estudos, e o mecanismo de desregulação parece ser variado, levando a uma menor ou maior expressão dos genes *HOX* dependendo do tipo de tumor. Essa característica tecido-específica faz com que os genes *HOX* atuem como supressores tumorais em alguns cânceres e como promotores tumorais em outros [18-21].

Abate-Shen (2002) [22] propôs que os genes *HOX* podem perder seu controle de três maneiras:

- A. **Temporo-espacial:** padrão de expressão dos genes *HOX* no tecido tumoral difere em relação ao tecido normal;
- B. **Dominância gênica:** uma classe de genes *HOX* está mais expresso no tecido tumoral do que a classe que normalmente está expressa no seu equivalente normal;
- C. **Hipoexpressão:** uma classe de genes *HOX* está menos expressa no tecido tumoral do que a classe que normalmente está expressa no seu equivalente normal.

Os dois primeiros mecanismos ocorrem quando a expressão dos genes *HOX* é associada com a oncogênese, e o terceiro é evidente em tecidos nos quais os genes *HOX* funcionam como supressor tumoral. Nesse caso, a regulação pode ser por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA [23, 24]; por miRNAs [25, 26]; e os mediados por RNAs não-codificantes longos (lncRNAs) [27-29].

Portanto, entender como a expressão aberrante dos genes *HOX* afeta o desenvolvimento e progressão dos tumores é de suma importância, tanto pelo entendimento do seu papel carcinogênico, como para que novas formas de tratamentos e terapias sejam desenvolvidas. Como a expressão diferencial dos genes *HOX* e seu comportamento na carcinogênese pode variar dependendo do tipo tumoral, é necessário que este estudo seja feito separadamente para cada tipo de tumor.

1.4. Resultados obtidos pelo grupo sobre genes *HOX* na tumorigênese do câncer de cabeça e pescoço.

O presente trabalho faz parte de um projeto maior do nosso grupo, que busca entender de forma ampla o papel dos genes *HOX* na tumorigênese de vários cânceres. O primeiro artigo publicado fruto desse esforço, aplicou abordagem de microarranjos de RNA para investigar a expressão de genes associados com a progressão do carcinoma de células escamosas da laringe (CCEL). Entre os genes hiperexpressos, foram encontrados oito membros da família de genes *HOX* (*HOXA10*, *HOXA11-AS1*, *HOXC8*, *HOXC9*, *HOXC10*, *HOXC13*, *HOXD10* e *HOXD11*) (Fig. 4A). A validação por RT-qPCR mostrou que esses genes estavam até 16 vezes mais

expressos nas amostras de tumor quando comparado a tecidos normais (Fig. 4B). No mesmo estudo, os ensaios usando sondas de esiRNA contra os genes *HOXC8*, *HOXD10* e *HOXD11*, em duas linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (FaDu e UMSCC-14), revelaram que os três genes poderiam atuar sobre a capacidade de formação de colônias e migração celular (Fig. 4C, D). As linhagens FaDu (carcinoma de faringe) e UMSCC-14 (carcinoma de assoalho bucal) foram escolhidas como modelo experimental por serem representativas do tipo de câncer estudado, uma vez, que não havia disponibilidade de linhagens derivadas de carcinoma de células escamosas de laringe [30].

Figura 4. **Resumo dos resultados obtidos por Bueno & Ramão et al. (2016).** (A) HeatMap dos genes *HOX* encontrados por Bueno & Ramão et al. (2016), em análise por *RNA microarray*. (B) Validação de dados transcriptômicos por RT-qPCR. A análise foi realizada para os genes *HOXC8*, *HOXC9*, *HOXC10*, *HOXC13*, *HOXD10*, *HOXD11*, *HOXA10* e *HOXA11-AS1*. (C) Ensaio de formação de migração celular em células FaDu e UMSCC-14 após o silenciamento dos genes *HOXC8*, *HOXD10* e *HOXD11*. Imagens representativas da superfície inferior do *transwell*, mostrando células migratórias coradas: FaDu (painel superior) e UMSCC-14 (painel inferior). (D) Ensaio de formação de colônia celular em células FaDu e UMSCC-14 após o silenciamento dos genes *HOXC8*, *HOXD10* e *HOXD11*. Imagem representativa mostrando colônias formadas por células FaDu (à esquerda) e células UMSCC-14 (à direita) após 12

também que eles possam regular o mecanismo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) (Fig. 6).

Figura 6. **O silenciamento dos genes *HOXC9*, *HOXC10* e *HOXC13* reduz a mobilidade celular e formação de colônias.** (A) Imagens representativas mostrando colônias formadas por células FaDu (painel superior) e células UMSCC-1 (painel inferior) após 14 dias de transfecção com esiRNA de controle (esiEGFP) ou esiRNAs *HOXA10*, *HOXC9*, *HOXC10* ou *HOXC13*. (B) Gráfico de barras mostrando a quantificação de colônias; FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). (C) Imagens representativas das células migratórias coradas: FaDu (painel superior) e UMSCC-1 (painel inferior). (D) Gráfico de barras mostrando o número de células migratórias; FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). O teste de *Kruskal-Wallis* seguido de *post hoc Dunn* foi usado para análise estatística. ns: não significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Fonte: Aguiar, 2017 (Monografia).

Vários estudos têm associado os genes *HOX* com o desenvolvimento de diferentes tipos tumorais, uma vez que esses genes participam do controle de vários processos biológicos, especialmente durante a embriogênese. A avaliação dos genes *HOX* em câncer de cabeça e pescoço, realizada pelo nosso grupo, evidenciou um claro padrão de genes hiperexpressos e de regulação em processos de migração e proliferação celular. Entre eles, o gene *HOXC13* destacou-se pelo seu alto nível de expressão (Fig. 4B) e melhor desempenho quanto a redução da capacidade migratória e proliferativa após a redução da sua expressão (Fig. 6).

Além das análises moleculares realizadas, também geramos dados *in silico* de alvos preditos para o *HOXC13*, onde identificamos mais de mil alvos, sendo que alguns deles regulam a migração e a proliferação celular. Sendo assim, este trabalho teve o propósito de ampliar as análises realizadas durante a minha iniciação científica, validando experimentalmente alguns dos genes alvos preditos de *HOXC13* com ênfase na regulação dos mecanismos de EMT e proliferação celular. Acreditamos que os resultados possam apresentar bases científicas para sugerir novos biomarcadores que auxiliem na melhor conduta terapêutica do câncer de cabeça e pescoço.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo investigar o papel do fator de transcrição HOXC13 na regulação da proliferação e migração celular, bem como validar alguns genes alvos, a fim de elucidar por quais mecanismos esta proteína atua nos processos biológicos relacionados ao câncer de cabeça e pescoço.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do silenciamento do HOXC13 no ciclo celular e na expressão de marcadores de ciclo celular e EMT.
2. Selecionar os genes alvos preditos do HOXC13 pela análise de enriquecimento de vias envolvidas com os processos biológicos de migração e proliferação celular.
3. Identificar genes alvos do HOXC13 em amostras de linhagens de câncer de cabeça e pescoço.
4. Avaliar o impacto do silenciamento do HOXC13 na transcrição dos genes alvos selecionados na etapa 2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e biossegurança

Este trabalho foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) com o número de processo 297/2019.002-02 e dispensado de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa pela coordenação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Anexo).

3.2. Análise de vias enriquecidas

Analisamos as vias gênicas enriquecidas em câncer de cabeça e pescoço com a plataforma WebGestalt GSAT (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*) e GSEA (*MSigDB*), pela via de *Reactome*, e *Network Analyst*, pela via de *KEGG* [33-38]. Para tanto, selecionamos somente os genes alvos preditos com correlação positiva de expressão maior que 0.4 ($R > 0.4$).

3.3. Customização de *primers*

Os *primers* utilizados neste trabalho foram customizados pelo *software Geneious Prime* [39]. A porcentagem de CG, temperatura de *melting* (T_m) e formação de *hairpins* foram analisados utilizando a plataforma online *Oligo Analyzer* da empresa IDT. *PCR in silico* foi realizado através da plataforma *UCSC Genome Browser* para verificação do pareamento dos *primers* na região genômica desejada [40].

O gene *HOXC13* foi amplificado através de PCR convencional empregando os *primers* apresentados na tabela 2 para adição de sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *NotI*. O *primer reverse* (*NotI*-*HOXC13*-R) foi desenhado retirando-se o *stop* códon do gene *HOXC13* para que houvesse a tradução da proteína *HOXC13* seguida da tradução dos nucleotídeos que codificam a proteína HA (hemaglutinina- peptídeo YPYDVPDYA). Em vermelho, temos os sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *NotI*, compatíveis com o vetor pOZ-FH-C (Fig. 8). Para os *primers* customizados para amplificação da região promotora dos genes alvos preditos (tabela 3), foram realizados testes de eficiência por PCR convencional, com variação de cinco temperaturas a cada dois graus Celsius (58°C a 66°C). Para os *primers* de análise de expressão (tabela 1 e 4) foram realizadas curvas-padrão. Tais curvas foram realizadas em cinco pontos (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) em triplicata, sendo que as

curvas de *melting* foram checadas quanto a formação de dímeros de *primer* e bandas contaminantes. Foram selecionados somente os pares de *primers* que apresentaram eficiência de pareamento entre 90-110%.

As tabelas abaixo mostram a sequência de cada par de *primers* customizados para cada etapa do trabalho.

Tabela 1. Sequência dos primers para amplificação de genes marcadores do ciclo celular e EMT.

Nome	Sequência (5' → 3')
Ciclina D1-F	GCTGCGAAGTGGAACCATC
Ciclina D1-R	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
E-caderina-F	CGAGAGCTACACGTTACGG
E-caderina-R	GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
Vimentina-F	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC
Vimentina-R	CATTTACGCATCTGGCGTTC

Tabela 2. Sequência dos *primers* para superexpressão do HOXC13-HA.

Nome	Sequência (5' → 3')
XhoI-HOXC13-F	CCGCTCGAGATGACGACTTCGCTGCTCCTGCA
NotI-HOXC13-R	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGTGGAGTGGAGATGAGGCGC

Tabela 3. Sequência dos *primers* para amplificação da região promotora dos genes alvos preditos.

Nome	Sequência (5' → 3')
ChIP-ALKBH8-F	CTTTGCCAGCCTCTCCACTC
ChIP-ALKBH8-R	CAGTTTTCTCCAACATGGCCG
ChIP-ARHGEF18-F	GTCTTGCTGTCCGTTTCCGAG
ChIP-ARHGEF18-R	TCTCAGAAAGGTACAGCAAGACC
ChIP-EIF4B-F	AGGCAGTAATGGTAGACTCTGG
ChIP-EIF4B-R	TGATTACGTCTACGAAAAGGC
ChIP-LAMA3-F	ACTGTGTCCTCCACTAAGATGGA
ChIP-LAMA3-R	GCTGTCCATGATGATAGCAAGA
ChIP-MYH10-F	CTTTCCTTTGGCCCCAATTGC
ChIP-MYH10-R	TAGCTGTCTTAGAGGTAGAGGGA

ChIP-PARD3-F	TGGGACCAAGAGAAGAGCAGA
ChIP-PARD3-R	GGCTGCTAGTGTACCTTCCAT
ChIP-PFDN1-F	ACTTACCCGACCCAGACCAA
ChIP-PFDN1-R	AGTCCTAAGGCCTCACTGGG
ChIP-PIK3CD-F	ACTTTAGAGTCAAATGGGTGCTC
ChIP-PIK3CD-R	TAAAACTGGTTGGAGTCGCTG
ChIP-PRKCA-F	TGGAATGGAAGGGAATGATTTGA
ChIP-PRKCA-R	TGCCCTTACGCTAATCTTACTTGA
ChIP-TJP1-F	CCGATACCCGACAGTTGTTT
ChIP-TJP1-R	AGAAAATGCATTCCGCCTTC

Tabela 4. Sequência dos *primers* para amplificação dos genes alvos preditos selecionados (expressão).

Nome	Sequência (5' → 3')
PCR-ALKBH8-F	ATGGACAGCAACCATCAAAGTAA
PCR-ALKBH8-R	GGCTCTGAGTGGCATAGGATAC
PCR-ARHGEF18-F	AATTGGCAACTTCTCCATCG
PCR-ARHGEF18-R	CTCCACCAGCACTGGGTATT
PCR-EIF4B-F	AGAATGGGACTGCATTGGAC
PCR-EIF4B-R	CCCCTATTACCTGGTGCAAA
PCR-LAMA3-F	TGCTAACAGTATCCGGGATTCT
PCR-LAMA3-R	TCTTGTTCAAGCCATTTGCC
PCR-PARD3-F	ACCTGAAGTGGAGGATGACG
PCR-PARD3-R	GCCCCAATTTTTGGTGTATG
PCR-PFDN1-F	AACTCCCAGGAGAGGGAAGA
PCR-PFDN1-R	AGGCTTAGCAGAGTGGGACA
PCR-PIK3CD-F	TCAACTCACAGATCAGCCTCC
PCR-PIK3CD-R	CGCGAAAGTCGTTCACTTCT
PCR-TJP1-F	ACCAGTAAGTCGTCCTGATCC
PCR-TJP1-R	TCGGCCAAATCTTCTCACTCC

3.4. Manutenção e expansão das linhagens

As linhagens HaCat (queratinócito da pele humana) e UMSCC-1 (tumor de assoalho bucal) foram mantidas em meio DMEM *High Glucose* e a linhagem FaDu (tumor de faringe), em meio DMEM *Low Glucose* (Thermo Fisher Scientific), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibiótico e mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37°C. As células foram testadas regularmente para identificar possíveis contaminações por bactérias do gênero *Mycoplasma*.

A linhagem HaCat foi utilizada para amplificação do gene *HOXC13*, pois, segundo o banco de dados *The Human Protein Atlas* [41], é a linhagem celular com maior expressão desse gene (Fig. 11). As linhagens UMSCC-1 e FaDu foram utilizadas para a transdução do vetor de expressão para superexpressar o gene *HOXC13* acoplado a tag HA.

3.5. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit comercial *Direct-zol RNA Mini-prep* (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante.

3.6. Síntese de cDNA

Os cDNAs foram preparados utilizando o kit *High Capacity* (Thermo Fisher Scientific) segundo o seguinte protocolo (para 1 µg de RNA): 2 µl RT solução-tampão 10x, 0,8 µl dNTPs, 2 µl 10x RT *Random Primer*, 1 µl enzima *multiscribe* e 4,2 µl água ultrapura. Ciclo: 25°C (10 minutos); 37°C (2 horas); e 4°C (infinito).

Para síntese de cDNA, a partir do RNA total da linhagem HaCaT, foi utilizado o *Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer* (Thermo Fisher Scientific) no lugar do *Random Primer*, para que ocorresse a hibridação com a cauda poli(A) do mRNA, e fosforilação na extremidade 5' para facilitar a clonagem do cDNA.

3.7. Análise dos níveis de expressão por meio de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para a amplificação da região promotora e para a análise de expressão de genes marcadores do ciclo celular e EMT, bem como dos genes alvos preditos foram confeccionados *primers* (tabela 1, 3 e 4) utilizados com *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). Para os genes envolvidos com EMT (*SNAI2*, *TWIST1*, *TFGB1* e *TGFB1*) foram utilizadas sondas do tipo *TaqMan®* (IDT) e *Taqman® Universal PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas em triplicada com amostras de DNA imunoprecipitado ou cDNA diluídos no aparelho *7500 Real Time PCR System*, produzido pelo mesmo fabricante.

O seguinte ciclo foi utilizado: 95°C (10 minutos); seguidos de 40 ciclos de 95°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto).

Para a análise de expressão de mRNA, os valores de Ct dos genes analisados foram normalizados com os dados relativos as médias geométricas do mRNA do *GAPDH* ou *TBP*.

3.8. Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada por coloração com iodeto de propídio (PI) e realizado *sorting* por citometria de fluxo. As células das linhagens FaDu ou UMSCC-1 (1x10⁵) foram fixadas em etanol 70% por 24 horas e, em seguida, incubadas com

RNAse A (0,1 mg/ml) (Sigma Aldrich) diluído em PBS-EDTA a 37°C por 30 minutos. O *pellet* de células foi ressuspensionado em 160µl de PBS-EDTA e 40µl de PI. As amostras foram submetidas ao citômetro de fluxo *FACScalibur* (BD - Becton Dickinson) e os dados resultantes foram analisados no *software ModFit LT 5.0*.

3.9. Construção dos vetores de expressão

3.9.1. Subclonagem no vetor de clonagem pGem

Decidimos subclonar nosso produto de PCR no vetor de clonagem *pGEM-T[®] easy* (Promega) (Fig. 7), antes de cloná-lo no plasmídeo pOZ-FH-C (Fig. 8), pois durante a reação de PCR utilizando a Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), há a adição de desoxiadenosinas em ambas as extremidades do DNA formado. O plasmídeo *pGEM-T[®] easy* está disponível comercialmente linearizado na região do gene para a β -galactosidase (*lacZ*) e tem uma timidina adicionada nas extremidades 3' das fitas (Fig. 7). Portanto, após a purificação do produto de PCR o DNA foi usado numa reação de ligação. Para esta reação foram misturados 1µl do vetor, 5µl do produto do PCR, 7,5µl do solução-tampão 2x e 1,5µl da enzima T4 DNA Ligase. A reação foi incubada *overnight* na geladeira. Posteriormente, todo o volume da reação (+/- 15µl) foi adicionado às bactérias cálcio-competentes DH5 α . A transformação por choque térmico se deu pela seguinte maneira: 15 minutos no gelo, seguido de 3 minutos a 42°C, seguido de mais 2 minutos no gelo. Em seguida, as bactérias foram transferidas para um tubo contendo 1,5ml de meio LB líquido (sem antibiótico) e crescidas em agitação de 200 rpm a 37°C por 2 horas.

As bactérias competentes foram semeadas em placas contendo meio LB + ágar (suplementado com 100mg/ml de antibiótico ampicilina, 120µl de X-Gal (20mg/ml) e 40µl de IPTG (100uM)) e incubadas a 37°C *overnight*.

Seis colônias brancas, que haviam sido transformadas com o vetor de interesse, foram coletadas para a realização de um PCR convencional para confirmação da transformação. Cada colônia foi coletada com uma ponteira estéril e imersa em 4µl de água estéril, o restante foi novamente semeado em uma nova placa contendo meio LB + ágar suplementado com ampicilina. Com a água + bactérias foi realizado um PCR convencional usando os primers da tabela 2.

Os produtos das PCRs foram checados por meio de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 2% contendo *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo

Fisher Scientific). As bandas produzidas continham o tamanho esperado (~1kb) para as seis colônias. Uma mini preparação plasmidial (mini-prep) foi realizada para duas das seis colônias usando o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foram realizadas reações de digestão utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, o protocolo utilizado foi 500-600ng de DNA plasmidial (vetor), 2µl de solução-tampão 10x (*Fast Digest*), 1µl enzima *EcoRI*, 1µl enzima *BamHI*, completado para 20µl com água estéril. Incubação de 1 hora a 37°C. Os produtos das digestões foram checados em gel de agarose, confirmando a inserção do gene *HOXC13* de interesse no vetor pGem.

As bactérias positivas foram congeladas a -80°C na presença de LB-glicerol 25%.

Figura 7. **Vetor pGEM-T[®] easy mostrando os sítios de restrição presentes.** Mapa do vetor de clonagem pGEM-T[®] easy utilizado nas subclonagens de superexpressão do HOXC13.

3.9.2. Clonagem no vetor de expressão pOZ-FH-C

Foram realizadas duas reações de digestão, utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI*, nos vetores pGEM-HOXC13 (para liberação do gene *HOXC13*) e pOZ-FH-C (para a abertura deste) (Fig. 8), da seguinte maneira: 2µl enzima *XhoI*, 2µl enzima *NotI*, 2µg plasmídeo pOZ-FH-C ou 4µg plasmídeo pGem-HOXC13, 4µl solução-tampão 10x, completado para 40µl com água estéril. Incubação de 4 horas ou *overnight* a 37°C.

Posteriormente, os produtos das reações de digestão foram checados em gel de agarose 1%. As bandas de tamanhos almejados (*HOXC13* – 1kb e pOZ – 7.9kb) foram purificadas utilizando o kit comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, uma reação de ligação entre o gene *HOXC13* e o vetor de expressão pOZ foi realizada utilizando 50ng do DNA plasmidial pOZ, 150ng do gene *HOXC13*, 1µl enzima T4 DNA ligase, 4µl solução-tampão 5x, completado para 20µl com água estéril. Uma nova transformação das bactérias competentes DH5α, seguida de uma nova checagem de transformação por PCR convencional foram realizadas. Após a confirmação da inserção do gene *HOXC13* no vetor pOZ, uma midi-prep foi realizada, utilizando o kit comercial *HiSpeed Plasmid Midi* (Qiagen), para obtenção de um maior volume de plasmídeos.

Figura 8. Mapa do vetor de expressão pOZ-FH-C utilizado nas clonagens de superexpressão do HOXC13. A. Vetor pOZ-FH-C, mostrando os sítios de restrição presentes. **B.** Sequência parcial do pOZ, realçando os sítios de restrição que foram utilizados na clonagem, bem como a sequência codificadora de HA.

3.10. Produção de retrovírus

Em placas de 6 poços, células da linhagem HEK293T foram plaqueadas em meio DMEM *High Glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de *Penicillin-Streptomycin*, todos os reagentes da empresa Thermo Fisher Scientific. No dia seguinte, todo o meio foi trocado por meio fresco e após 2 horas as células foram co-transfectadas com os seguintes vetores: 1,5µg do plasmídeo ENV (para formação do envelope viral), 7,5µg do plasmídeo GAG-POL (para formação das enzimas virais, em especial a *Transcriptase reserva*, e proteínas do capsídeo viral), 7,5µg do plasmídeo de interesse (pOZ-*HOXC13*) ou plasmídeo controle (pOZ vazio), 49,5µL do agente de transfecção PEI MAX (Sinapse), e completado para o volume

final de 600µL com meio não suplementado com SFB. Essa mistura, antes de ser adicionadas as células, ficou incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, após esse tempo a solução foi adicionada a placa, gota a gota (100µL por poço). Em seguida, a placa foi centrifugada a 1000 xg por 30 minutos, para otimização da transfecção, e incubada a 37°C.

Após 12-15 horas de transfecção, o meio das células foi trocado por meio fresco suplementado com 30% de SFB, e estas foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas. No dia seguinte, o meio de cada poço, contendo os retrovírus produzidos, foi coletado e armazenado em geladeira. Um novo meio com 30% de SFB foi adicionado as células. As células das linhagens a serem transduzidas (FaDu e UMSCC-1) foram plaqueadas em placas de 6 poços em confluência de 30 a 50%.

3.11. Transdução retroviral nas linhagens FaDu e UMSCC-1

Após 24 horas, o meio da linhagem HEK293T foi novamente coletado e agrupado ao meio coletado do dia anterior, depois filtrado em filtro PVDF de 0,45µm e colocado na placa correspondente as células das linhagens tumorais a serem transduzidas, sendo que o meio destas foi previamente descartado. Em adição ao meio contendo retrovírus, foi adicionado brometo de hexadimetrina (8µg/ml) com a finalidade de facilitar a infecção. O meio com vírus restante foi congelado em -80°C para uso posterior.

O procedimento do parágrafo anterior foi repetido por mais 3 dias seguidos.

3.12. Análise da expressão da proteína HOXC13-HA após a transdução

Após 4 dias de transdução, as células tumorais FaDu e UMSCC-1 foram mantidas em cultura por mais 2 dias com meio suplementado com 20% de SFB para recuperação. Após esse tempo, parte foi congelada em -80°C e parte teve seu extrato proteico extraído para a análise da eficiência da transdução e da superexpressão da proteína HOXC13-HA pela técnica *Western Blot*. As células foram lisadas com tampão RIPA (radioimunoprecipitação), suplementado com inibidores de protease. Os extratos proteicos foram quantificados utilizando o *kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. 50µg de proteína total por amostra foram separados em gel de poliacrilamida a 12% por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram marcadas com o anticorpo anti-HA (Abcam - ab9110) e o endógeno anti-GAPDH

(Abcam - ab9485). As bandas foram visualizadas no aparelho *ImageQuant* (GE Healthcare) por quimiluminescência usando o *ECL™ Prime Western Blotting System* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

3.13. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

A técnica de imunoprecipitação da cromatina foi realizada seguindo o protocolo determinado pelo kit *SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit* (Cell Signaling Technology). Foi necessário a padronização do tempo de fragmentação com a enzima *Micrococcal Nuclease* para 5 minutos. O anticorpo utilizado para a imunoprecipitação foi o anti-HA (Abcam - ab9110), pois não há anticorpos anti-HOXC13 padronizados para ChIP e por isso usamos a abordagem de fusionar a proteína HOXC13 com a tag HA, que por sua vez contém anticorpo comercial já validado [42].

Como controle positivo foi utilizado o anticorpo *Histone H3 XP Rabbit mAb* e como controle negativo, o anticorpo *Normal Rabbit IgG*, ambos fornecidos pelo kit *SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit* (Cell Signaling Technology).

Uma segunda imunoprecipitação foi realizada usando um segundo protocolo, o *EZ - Magna ChIP G kit* (Milipore), que possui como método de fragmentação de DNA a sonicação e usa como controle positivo o anticorpo *RNA polymerase II*. Após padronização, foi realizada a fragmentação de DNA por sonicação de 8 pulsos.

De modo geral, a ChIP utilizou 4×10^6 células por imunoprecipitação para o *SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit* e 1×10^7 células para o *EZ - Magna ChIP G kit*. As células utilizadas foram as linhagens FaDu e UMSCC-1 superexpressando a proteína HOXC13-HA, bem como transfectadas com o vetor de expressão vazio pOZ (controle). Em seguida, as amostras, para ambos os kits, foram tratadas com formaldeído (Sigma-Aldrich) na concentração final de 1% por 10 minutos a temperatura ambiente. O formaldeído tem por função fixar a interação da proteína ao DNA, processo conhecido como *crosslink*. A neutralização das ligações covalentes foi feita adicionando glicina 10x por 5 minutos, com leve agitação. Em seguida, foi realizada lavagens com PBS 1x gelado.

A lise das células foi feita utilizando tampão de lise celular suplementado com inibidores de protease - para o *EZ - Magna ChIP G kit* utilizou também agulhas e seringas para ajudar no processo de lise. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso com tampão de lise nuclear para liberação da cromatina – para o

SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit houve um passo adicional de centrifugação e ressuspensão do *pellet* formado pelo tampão de ChIP.

Após essas etapas, as amostras foram submetidas ao processo de fragmentação da cromatina pela enzima *Micrococcal nuclease* ou por sonicação, de acordo com o kit utilizado. Para fragmentação enzimática foi utilizado 0,5µl de enzima e o processo ocorreu em banho seco a 37°C por 5 minutos. O aparelho utilizado para a sonicação foi o *Vibra-Cell™ Ultrasonic* modelo VCX-130 com 8 pulsos de 30 segundos (30% de amplitude), com intervalos de 60 segundos em descanso, sempre no gelo. Após a fragmentação, uma checagem da eficiência do processo foi realizada revertendo o *crosslink* por digestão da enzima *Proteinase K* e aplicação em gel de agarose 2%.

Após a checagem das condições da fragmentação, as amostras foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão de diluição de cromatina. A imunoprecipitação da cromatina foi realizada utilizando anticorpos controles (IgG, Histona H3 e/ou RNA polimerase II) e o anticorpo anti-HA. Foi retirado 10µl da amostra de cromatina diluída, sendo esta a amostra correspondendo a 2% da cromatina total, em outras palavras, a amostra *input*. Em seguida, a cada amostra do *SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit* foi adicionado o anticorpo específico (Anti-HA, *Normal Rabbit IgG* ou *Histone H3 XP Rabbit mAb*), segundo as recomendações dos fabricantes, e incubadas a 4°C *overnight* sob rotação. No dia seguinte, foram adicionadas as *beads* magnéticas revestidas com proteína G à reação anticorpo + cromatina fragmentada, e deixadas por 2 horas a 4°C sob rotação. No caso do *EZ - Magna ChIP G kit*, os anticorpos (Anti-HA, *Normal Mouse IgG* ou *RNA Polymerase II*) foram incubados com as *beads* magnéticas a 4°C *overnight*, e, no dia seguinte, após a ligação das *beads* com o anticorpo específico, a cromatina fragmentada foi adicionada e a reação foi novamente incubada a 4°C *overnight* sob rotação.

Essas incubações têm por objetivo formar um complexo de *beads*, anticorpo e DNA alvo. Com a ajuda de uma estante magnética, foram realizadas lavagens utilizando tampões com alto e baixo teor de sal, para a retirada de fragmentos que não haviam criado o complexo *bead*-anticorpo-DNA, seguindo as instruções de cada kit. Em seguida, foi realizada a eluição da cromatina do complexo, seguido da reversão do *crosslink*. A cromatina imunoprecipitada e a amostra *input* do *SimpleChIP*

Enzymatic Chromatin IP Kit foram primeiramente eluídas com tampão de eluição e incubadas a 65°C por 30 minutos sob leve agitação. Logo após, as cromatinas eluídas foram transferidas para um novo tubo e adicionadas a elas a enzima *Proteinase K*, para reversão do *crosslink*, e incubadas a 65°C por 2 horas. Já à cromatina imunoprecipitada e à amostra *input* do *EZ - Magna ChIP G kit* foi adicionado o tampão de eluição juntamente com a enzima *Proteinase K* e feita uma primeira incubação de 2 horas a 62°C sob leve agitação, seguida de uma segunda incubação de 10 minutos a 95°C. Após as incubações, a cromatina eluída foi transferida para um novo tubo.

No passo seguinte foi realizada a purificação e eluição do DNA imunoprecipitado e do DNA da amostra *input* com o uso de colunas dos próprios kits. A quantidade e qualidade do DNA foi analisado pelo fluorômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific).

3.14. Amplificação dos genes alvos por PCR em tempo real (RT-qPCR)

O protocolo utilizado para a realização da amplificação dos genes alvos por RT-qPCR foi descrito no item 3.7 e a quantidade de amostra de DNA imunoprecipitado purificado foi de 2µl por poço da placa.

A análise da porcentagem de *input* foi realizada seguindo as explicações da plataforma online *TTB – Top Tip Bio* [43]. A quantidade de amostra de cromatina do *input* utilizada nos experimentos foi de 2%, seguindo o protocolo dos fabricantes dos kits. Essa amostra representa 2% da amostra total de cromatina utilizada na imunoprecipitação, por isso precisou-se subtrair o log do fator de diluição usado do valor de Ct da amostra *input*. Como foram usados 2% de cromatina na amostra de *input*, o valor do fator de diluição é 50, sendo assim o valor de $\log(50)_2$ é de 5,64. Então subtraiu-se esse resultado do valor de Ct das amostras *inputs*.

Após o ajuste do Ct do *input*, foi realizada a diferença de valores Ct entre o *input* ajustado e amostra imunoprecipitada com o anticorpo de interesse (Anti-HA, IgG, Histona H3 ou RNA polimerase II):

$$\text{Delta Ct} = \text{Ct anticorpo de interesse} - \text{Ct input ajustado}$$

Ao final, foi calculado a porcentagem de *input* (% *input*) com a seguinte fórmula:

$$100 * 2^{(\text{Delta Ct})}$$

A multiplicação por 100 é para obter o valor final em porcentagem.

3.15. Silenciamento gênico transiente e análise de correlação de expressão

Com o intuito de verificar a correlação de expressão entre o gene *HOXC13* e os genes marcadores de ciclo celular e EMT e os genes alvos preditos selecionados, foi realizado o silenciamento transiente do gene *HOXC13* nas linhagens tumorais FaDu e UMSCC-1, utilizando o protocolo *MISSION esiRNA Technology* da empresa Sigma Aldrich, por transfecção reversa ou em suspensão. O protocolo consiste na utilização de um conjunto de oligos que cobrem toda extensão do mRNA do gene alvo. Abaixo está descrição das sequências do esiRNA controle (esiEGFP) e do esiHOXC13:

esiEGFP: (Cat#EHUEGFP) Seq:

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGAC
GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGGACTTCTTCAA
GTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC
AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACA
ACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAAC
ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGC
CCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGG
ACGAGCTGTA

esiHOXC13: (Cat#EHU034171) Seq:

CTCTCTGAGCGCCAGGTAACCATCTGGTTCCAGAACC GGCGGGTCAAAGAGAAGAAGGTGGTCA
GCAAATCGAAAGCGCCTCATCTCCACTCCACCTGACCACCCACCCGCTGCTTGCCCCATCTATTT
ATGTCTCCGCTTTGTACCATAACCGAACCACGGAAGACGCTGCGCGGGTGCAGAAGAGTATT
TAATGTTAAGGAAAGAGAAGAACC GCGCCGCGGAGGCAGAGAGGCTCCATGGCCGTGCTGC
TGGGCCATCCCAACTCCCTATCCATCCCCAGCCTCCACCCCATCCAGATGGGACTCACGTG
GCTTCAACAGCTTTTGAAATGGGTCCCGAGTGGGCCGTGCGAGGAAGGCTGTCGACCTCTACTC
CTCCTTGCGCTCACCTTGCCAGAAAGTC

Para cada poço de transfecção celular na placa de 24 poços, houve a diluição de 18pmol do esiRNA em 100µl do Opti-MEM® *Medium* (Thermo Fisher Scientific), com concentração final do esiRNA de 20nM. Em seguida 1µl do reagente *Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) foi adicionado a diluição e a solução incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Ao complexo de transfecção adicionou-se 10⁵ células diluídas em 200µl de meio suplementado com 10% de SFB, sem antibiótico. A placa com as células foi incubada em estufa a 37°C. Após 24 horas de transfecção, o meio das células foi retirado e trocado. Após 48h da transfecção, o RNA foi extraído e verificou-se o silenciamento genes *HOXC13* por RT-qPCR.

3.16. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o pacote de *software GraphPad Prism 7.0*. A significância estatística foi determinada pelo teste t de *Student*. Uma probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Todos os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Silenciamento do gene *HOXC13* leva a parada do ciclo celular e inibe o processo de EMT

Após observarmos que o silenciamento transiente do gene *HOXC13* leva a uma redução na formação de colônias e da capacidade migratória das linhagens FaDu e UMSCC-1 (Fig. 6), decidimos investigar seu papel tanto na via do ciclo celular, como no processo de transição epitelial-mesenquimal. Para isso realizamos um novo silenciamento utilizando sondas de esiRNA contra o gene *HOXC13* (Fig. 9), seguido de experimentos de citometria de fluxo, para checar se houve alteração em etapas do ciclo celular e análise dos níveis de Ciclina D1 e de dois marcadores de EMT, E-caderina (CDH1) (epitelial) e Vimentina (VIM) (mesenquimal).

Figura 9. **Silenciamento transiente da expressão do gene *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *HOXC13* na linhagem tumoral FaDu e UMSCC-1. Valores representativos de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. O teste t de *Student* foi usado para análise estatística. Fonte: esta dissertação.

Um aumento significativo de células em fase G0-G1 foi observado na linhagem UMSCC-1 (de 53% para 63%), bem como uma redução na fase S (de 29% para 19%) (Fig. 10). Não observamos alterações significativas na progressão do ciclo celular na

linhagem FaDu, resultado em concordância com o observado no ensaio de formação de colônias (Fig. 6).

Figura 10. **Redução da expressão do HOXC13 induz a parada do ciclo celular.** Gráfico de barras mostrando a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 e fase S na linhagem UMSCC-1. FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. O teste t de *Student* foi usado para análise estatística. ns: não significativo, * p < 0,05 e ** p < 0,01. Fonte: esta dissertação.

O controle do ciclo celular pode estar envolvido, direta ou indiretamente, à regulação dos níveis de ciclinas uma vez que observamos também uma redução da expressão do gene da Ciclina D1, após o silenciamento do *HOXC13* na linhagem UMSCC-1 (Fig. 11).

Figura 11. **Redução da expressão do marcador de ciclo celular, Ciclina D1, após silenciamento do HOXC13.** Gráfico de barras mostrando queda da expressão de *Ciclina D1* após o silenciamento do gene *HOXC13* na linhagem UMSCC-1. Valores representativos de 3 experimentos independentes. O teste t de *Student* foi usado para análise estatística. * p < 0,05. Fonte: esta dissertação.

Já com relação ao mecanismo de EMT, observamos um aumento significativo da expressão do marcador epitelial CDH1, após o silenciamento do gene *HOXC13* na linhagem UMSCC-1, e diminuição do marcador mesenquimal VIM (Fig. 12). Estes resultados sugerem que a queda da expressão do gene *HOXC13* inibe a migração celular *in vitro* pela interrupção da EMT (Fig. 6).

Figura 12. **Redução da expressão do HOXC13 regula o mecanismo de transição epitelial-mesenquimal.** (A) Gráfico de barras mostrando o nível de expressão de *E-caderina* e *Vimentina*; FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). (B) Gráfico de barras com a quantificação do nível de proteína de *E-caderina* normalizada pelo nível de GAPDH em células da linhagem UMSCC-1 transfectadas com esiHOXC13 em comparação com células controle esiEGFP (consideradas como 100%). Valores representativos de 3 experimentos independentes. O teste t de *Student* foi usado para análise estatística. ns: não significativo, * p < 0,05, ** p < 0,01 e ***p < 0,001. Fonte: esta dissertação.

4.2. Seleção dos genes alvos preditos e análise de vias enriquecidas

Com o apoio do nosso grupo de bioinformática, usando dados públicos da literatura científica, de *ChIP-seq* e predições de *motifs* de ligação no DNA, foi possível gerar uma lista preliminar de alvos preditos do fator de transcrição HOXC13. Uma análise combinada do nível de expressão do gene *HOXC13* e de seus possíveis alvos, obtidas por análise de dados de *RNA-seq* do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), aplicando um algoritmo para avaliar o grau de correlação de expressão entre eles,

chegamos em uma lista com mais de mil genes candidatos a alvos, que são transcricionalmente ativos ou inibidos pelo gene *HOXC13* (dados não publicados).

Em seguida, analisamos as vias gênicas enriquecidas dos genes candidatos a alvos de *HOXC13* em câncer de cabeça e pescoço com a plataforma WebGestalt GSAT (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*) e GSEA (*MSigDB*). Foram selecionados somente os genes alvos preditos com correlação positiva de expressão maior que 0.4 ($R > 0.4$). Desta forma foi gerada uma lista de 448 genes alvos preditos que foram usados na análise de enriquecimento. Adicionalmente, utilizamos os genes com correlação negativa, mas não houve enriquecimento de vias.

Os genes com correlação positiva à expressão do *HOXC13* foram enriquecidos em processos relacionados com a proliferação celular e o controle do ciclo celular, pela plataforma *WebGestalt GSAT* (Fig. 13A). Pela plataforma GSEA (Fig. 13B) obtivemos o enriquecimento para vias de proliferação celular e EMT. Esses resultados corroboram com as análises experimentais previamente realizadas (Fig. 6, 10-12).

Figura 13. Os genes alvos preditos do *HOXC13*, com correlação positiva, estão envolvidos com as vias de proliferação celular e transição epitélio-mesenquimal. (A) Gráfico representativo das vias enriquecidas de *Reactome* dos genes alvo preditos do *HOXC13*. (B) Gráfico representativo das vias canônicas enriquecidas dos genes alvos preditos do *HOXC13* pelo *Molecular Signatures Database* (*MSigDB*). FDR ≤ 0.05 . Fonte: esta dissertação.

Para validação experimental, decidimos considerar apenas os genes alvos preditos de *HOXC13*, mas que também já foram identificados anteriormente por *ChIP-seq*, ou que apresentavam predição de *motif* de interação com o *HOXC13*. Desta forma, selecionamos dentro destes critérios, 10 genes, cinco de cada origem, que estão envolvidos também com o desenvolvimento e/ou progressão tumoral (Tabela 5).

Estes 10 genes foram utilizados nos ensaios de interação de *HOXC13* por ChIP-qPCR.

Tabela 5. Genes alvos preditos selecionados para os ensaios de ChIP-qPCR.

Alvos	Nome completo	Método	Tumor (referências)
LAMA3	<i>laminin subunit alpha 3</i>	Motif	Câncer de cabeça e pescoço ¹ , adenocarcinoma pancreático ² , câncer de ovário ³ .
MYH10	<i>myosin heavy chain 10</i>		Glioblastoma ⁴
PARD3	<i>par-3 family cell polarity regulator</i>		Câncer de pulmão ⁵ , câncer de esôfago ⁶ , glioblastoma ⁷ , câncer de próstata ⁸ .
PIK3CD	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta</i>		Câncer de tireóide ⁹ , câncer de pulmão ¹⁰ , câncer de próstata ¹¹ , câncer colorretal ¹² .
PRKCA	<i>protein kinase C alpha</i>		Câncer de pulmão ¹³ , tumor primitivo neuroectodérmico ¹⁴ , câncer de colorretal ¹⁵ , câncer de mama ¹⁶ , câncer de esôfago ¹⁷ , câncer de bexiga ¹⁸ .

Após a amplificação da CDS do gene *HOXC13*, este foi subclonado no vetor de clonagem pGEM-T e posteriormente clonado no vetor de expressão pOZ-FH-C, para obter a superexpressão da proteína HOXC13-HA. Observamos que a superexpressão foi obtida com sucesso (Fig. 15).

Figura 15. **Superexpressão da proteína HOXC13-HA.** (A) Aumento dos níveis da proteína HOXC13-HA após sua superexpressão nas linhagens FaDu e UMSCC-1, por *western blot*. (B) Gráfico de barras com a quantificação relativa do nível de proteína HOXC13-HA normalizado pelo nível de GAPDH em células transfectadas com vetor de expressão pOZ-HOXC13-HA em comparação com células controle transfectadas com o vetor pOZ vazio. Fonte: esta dissertação.

4.4. Identificação dos genes alvos regulados por HOXC13 utilizando a técnica de ChIP-qPCR

4.4.1. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

Uma vez validada a eficiência da superexpressão da proteína HOXC13-HA nas linhagens FaDu e UMSCC-1, realizamos a técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) para identificação dos genes alvos regulados por HOXC13. A ChIP é uma técnica usada para sondar interações proteína-DNA no contexto natural da cromatina; é um ensaio utilizado para identificar diversas regiões do genoma associadas a uma determinada proteína, no nosso caso, o fator de transcrição HOXC13 [45-50].

Como citado na metodologia, utilizamos dois protocolos diferentes (*SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit* e *EZ – Magna ChIP G kit*) quanto a forma de fragmentação do DNA. Para o kit *SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP*, foi padronizado o tempo de

5 minutos de uso da enzima *Micrococcal nuclease*, uma endo-exonuclease que realiza quebras no DNA de tamanhos padronizados a cada 150 pb, entre nucleossomos. Com este tempo obtivemos uma maior concentração de fragmentos em torno de 300 e 450 pb, tamanhos considerados ótimos para a execução da ChIP (Fig. 16).

Figura 16. **Fragmentação da cromatina - SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit.** Imagem representativa da fragmentação da cromatina das linhagens celulares FaDu e UMSCC-1 com a enzima *Micrococcal Nuclease*. O DNA purificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1%. A segunda coluna mostra que a maioria da cromatina foi digerida em 1 a 5 nucleossomos (150 a 900 pb). O marcador de peso molecular utilizado possui fragmentos de 100 a 1.517 bp. Fonte: esta dissertação.

Para o kit *EZ – Magna ChIP G* a padronização da fragmentação do DNA ocorreu para o número de pulsos. Esse tipo de fragmentação, diferente da enzimática, quebra o DNA em tamanhos randômicos, não padronizados. O número de pulsos estabelecido foram 8 pulsos, caracterizando uma boa fragmentação (Fig. 17).

Figura 17. **Fragmentação da cromatina - EZ – Magna ChIP G kit.** Imagem representativa da fragmentação da cromatina por sonicação de 8 pulsos. O DNA purificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 2%. A maioria da cromatina foi fragmentada em tamanhos randômicos. O marcador de peso molecular utilizado possui fragmentos de 100 a 1.517 bp. Fonte: esta dissertação.

Após as imunoprecipitações da cromatina (ChIP), os DNAs imunoprecipitados foram purificados e quantificados.

4.4.2. Amplificação dos genes alvos por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Em seguida realizamos uma amplificação por RT-qPCR para somente 8 genes previamente selecionados a partir da lista da análise *in silico* dos genes alvos preditos (tabela 5). Devido a limitante quantidade de amostra de DNA imunoprecipitado purificado, não foi possível fazer a análise para os genes *LAMA3* e *PARD3*.

De modo geral, as análises de RT-qPCR das amostras oriundas da imunoprecipitação de cromatina (ChIP) da linhagem FaDu demonstraram que HOXC13-HA interagiu com todos os 8 genes analisados, o que foi observado por um maior enriquecimento de DNA imunoprecipitado com o anticorpo anti-HA, indicando que estes seriam alvos de regulação direta do fator de transcrição HOXC13 nessa linhagem (Fig. 18-25). Em adição, os resultados obtidos da imunoprecipitação da

cromatina da linhagem FaDu, transduzida com o vetor vazio pOZ, utilizando o mesmo anticorpo anti-HA, não indicaram enriquecimento de DNA de nenhum gene alvo de HOXC13, demonstrando que a interação entre anti-HA e os genes alvos era dependente de HOXC13 (Apêndice A).

- **Origem *in silico*: ChIP-seq**

Figura 18. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *ALKBH8*. Fonte: esta dissertação.

Figura 19. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *ARHGEF18*. Fonte: esta dissertação.

Figura 20. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *EIF4B*. Fonte: esta dissertação.

Figura 21. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PFDN1*. Fonte: esta dissertação.

Figura 22. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *TJP1*. Fonte: esta dissertação.

- Origem *in silico*: predição de motif

Figura 23. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *MYH10*. Fonte: esta dissertação.

Figura 24. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PIK3CD*. Fonte: esta dissertação.

Figura 25. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu superexpressando a proteína HOXC13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PRKCA*. Fonte: esta dissertação.

No entanto, nenhum dos resultados, de nenhum kit utilizado, foi satisfatório usando a linhagem UMSCC-1 (Apêndice B). Levantamos algumas hipóteses, mas não únicas, que poderiam explicar o porquê a análise por ChIP, para a linhagem UMSCC-1, não ter funcionado:

1. A linhagem UMSCC-1 possui uma característica distinta (até por se tratar de um outro tipo tumoral), que dificulta alguma etapa da imunoprecipitação de cromatina, como por exemplo, não fazer a fixação da proteína-DNA (*crosslink*) ou não reverter a fixação.

2. A proteína superexpressa com a tag HA (HOXC13-HA) não está localizada no núcleo, devido a presença da tag.
3. Competição entre a proteína HOXC13 naturalmente expressa e a proteína superexpressa HOXC13-HA pelo sítio regulatório dos genes alvos.
4. A proteína HOXC13 precisa formar um complexo transcricional com outra(s) proteína(s), mas devido a quantidade limitante desta(s) na célula, pois não houve superexpressão dela(s), mas somente do HOXC13-HA. Desta forma, não há a formação do complexo, consequentemente não há ligação na região regulatória do gene alvo.

Sendo assim, padronizações e novas análises são necessárias para esta linhagem.

4.5. Validação da correlação de expressão entre os genes alvos selecionados e o gene *HOXC13*

Em paralelo a confirmação de alguns genes alvos de HOXC13 pela técnica de ChIP-qPCR, realizamos a validação da correlação de expressão entre o gene *HOXC13* e os genes alvos selecionados. O objetivo foi verificar se o silenciamento do gene *HOXC13* afetaria a expressão desses genes por regulação negativa. Para tal, os níveis dos transcritos dos genes alvos foram medidos por RT-qPCR a partir das amostras das linhagens FaDu e UMSCC-1 após silenciamento do gene *HOXC13*.

Uma análise da eficiência dos *primers* de cada um dos 10 genes alvos preditos selecionados foi realizada. Somente 8 pares de *primers* apresentaram eficiência entre 90% a 110%, assim realizamos a análise de correlação de expressão somente para os genes *ALKBH8*, *ARHGEF18*, *EIF4B*, *LAMA3*, *PARD3*, *PFDN1*, *PIK3CD* e *TJP1*. Não foi realizada a análise para os genes *MYH10* e *PRKCA*.

A regulação negativa foi observada com significância para os genes *ARHGEF18* e *PARD3* em ambas as linhagens (Fig. 27 e 30) e para o gene *ALKBH8* na linhagem FaDu (Fig. 26), confirmando uma correlação positiva entre os genes e o *HOXC13*. Para a linhagem UMSCC-1, houve também uma redução na expressão dos genes *EIF4B* e *PIK3CD* (Fig. 28 e 32). Mesmo não havendo a confirmação pela ChIP desses genes serem alvos de HOXC13 nesta linhagem, podemos sugerir uma possível relação.

Já os genes *LAMA3* e *TJP1*, apesar de terem sido considerados genes alvos com correlação positiva para o gene *HOXC13* nas análises *in silico*, apresentaram aumento de expressão após o silenciamento do *HOXC13*, indicando uma possível regulação positiva (Fig. 29 e 33). O gene *PFDN1* não apresentou diferença significativa de expressão em nenhuma linhagem (Fig. 31).

Figura 26. **Validação da correlação de expressão entre o gene *ALKBH8* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *ALKBH8* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 27. **Validação da correlação de expressão entre o gene *ARHGEF18* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *ARHGEF18* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 28. **Validação da correlação de expressão entre o gene *EIF4B* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *EIF4B* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. **** $p < 0,0001$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 29. **Validação da correlação de expressão entre o gene *LAMA3* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *LAMA3* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 30. **Validação da correlação de expressão entre o gene *PARD3* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *PARD3* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 31. **Validação da correlação de expressão entre o gene *PFDN1* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *PFDN1* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 32. **Validação da correlação de expressão entre o gene *PIK3CD* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *PIK3CD* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

Figura 33. **Validação da correlação de expressão entre o gene *TJP1* e *HOXC13*.** Expressão relativa do gene *TJP1* após transfecção com esiEGFP (controle) e esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por RT-qPCR nas linhagens FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). Valores representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

A redução da capacidade migratória das linhagens FaDu e UMSCC-1 foi observada após a redução da expressão do gene *HOXC13*. O que sugeriu uma atuação desta proteína sobre o mecanismo de EMT (Fig. 6). Para corroborar com essa hipótese a redução da capacidade migratória destas linhagens foram acompanhadas de um aumento da expressão de *CDH1*, e na diminuição de *VIM* (Fig. 12).

Além disso, outros 4 genes envolvidos no mecanismo de transição epitelial-mesenquimal (*TWIST1*, *TGFB1*, *SNAI2* e *TGFB1*) foram encontrados como candidatos a serem regulados por *HOXC13* nas análises *in silico*, mas, diferentemente dos demais, continham evidências por dados de literatura. Portanto, estes 4 genes foram adicionados em nossas análises de RT-qPCR.

Os níveis dos transcritos dos genes *TWIST1*, *TGFB1* e *SNAI2* estavam diminuídos após silenciamento do gene *HOXC13*, em ambas linhagens, o que sugere a participação destes 3 genes no fenótipo de migração anteriormente observado (Fig. 34).

Figura 34. **Validação dos genes alvos preditos de *HOXC13* envolvidos no processo de EMT.** Expressão relativa dos genes alvos preditos do *HOXC13* (*SNAI2*, *TWIST1*, *TGFB1* e *TGFB1*) após transfecção com esiEGFP (controle) ou esiHOXC13. O nível de mRNA foi detectado por qRT-PCR, em FaDu (esquerda) e UMSCC-1 (direita). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Estatística realizada por Teste t de Student. Fonte: esta dissertação.

4.6. Análise de enriquecimento de processos biológicos.

Uma análise de vias de processos biológicos enriquecidas para o gene que confirmou ser alvo da proteína HOXC13 e apresentou regulação positiva, *ARHGEF18*, e também para o gene com regulação positiva, *PARD3*, foi realizada utilizando novamente as plataformas online WebGestalt GSAT (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*) e GSEA (*MSigDB*), pela via de *Reactome*.

Em ambas as análises, houve somente o enriquecimento da via de sinalização do receptor de TGF- β em EMT, com $FDR < 0,05$. Este resultado sugere que o fator de transcrição HOXC13 pode estar regulando o mecanismo de transição epitelial-mesenquimal, em câncer de cabeça e pescoço, pela via de sinalização do receptor de TGF- β , através do seu alvo ARHGEF18 e/ou de forma - direta ou indiretamente - pelo PARD3.

Já para os genes *EIF4B* e *PIK3CD*, pela plataforma GSEA (*MSigDB*), pela via de *KEGG*, enriqueceram para a via de sinalização de mTOR ($FDR < 0,05$), e pela plataforma *Network Analyst*, além da via de mTOR, também houve o enriquecimento da via de sinalização de PI3K-Akt. A sugestão aqui é que HOXC13 tem papel importante no processo proliferativo do câncer de cabeça e pescoço através da regulação de seus alvos EIF4B e PIK3CD.

O gene *ALKBH8* não enriqueceu para nenhuma via, em nenhuma plataforma.

Tabela 6. Vias de processos biológicos enriquecidas.

Plataforma	Via	FDR	Gene
WebGestalt GSAT GSEA (<i>MSigDB</i>)	Via de sinalização do receptor de TGF- β em EMT	<0.05	<i>ARHGEF18</i> e <i>PARD3</i>
GSEA (<i>MSigDB</i>)	Via de sinalização de mTOR	<0.05	<i>EIF4B</i> e <i>PIK3CD</i>
<i>Network Analyst</i>	Via de sinalização de mTOR	<0.05	<i>EIF4B</i> e <i>PIK3CD</i>
<i>Network Analyst</i>	Via de sinalização de PI3K-Akt	<0.05	<i>EIF4B</i> e <i>PIK3CD</i>

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm apontado uma relação entre a desregulação dos membros da família HOX em diferentes tipos de tumores. Tal desregulação se dá por múltiplos mecanismos e de acordo com cada tecido, indicando uma característica tecido-específica dos genes *HOX* [12]. Estudos prévios do nosso grupo mostraram a ação desses genes desregulados no câncer de cabeça e pescoço, em que foi possível observar que a regulação positiva de alguns membros dessa família está envolvida com a capacidade proliferativa e migratória desse tumor (Fig. 4 e 6) [30].

Neste trabalho, investigamos o papel do gene *HOXC13* na regulação da proliferação celular e do mecanismo de EMT, bem como validamos seus alvos e as vias gênicas enriquecidas por eles.

O silenciamento transiente do gene *HOXC13* levou a uma parada do ciclo celular nas fases G1 e S (Fig. 10) e a redução da expressão do marcador de ciclo celular, Ciclina D1 (Fig. 11), na linhagem UMSCC-1. Esse dado corrobora com os resultados de enriquecimento de vias gênicas, com destaque para as vias de replicação de DNA e controle do ciclo celular. A participação de *HOXC13* na proliferação celular tem sido reportada em câncer de pulmão, modulando a expressão das Ciclinas D1 e E1, bem como em câncer de colorretal; e no câncer de esôfago, *HOXC13* atua reprimindo a expressão de *CASP3* [51-53]. Assim, tanto nossos achados na linhagem UMSCC-1, como o enriquecimento de vias biológicas e dados da literatura apoiam um papel do gene *HOXC13* na indução da proliferação e do ciclo celular, através da ativação ou repressão transcricional de genes-chaves envolvidos nesses processos biológicos e em diferentes tipos de tumores.

A ausência de efeitos quanto a proliferação e a regulação do ciclo celular na linhagem FaDu pode estar relacionada a uma carga mutacional em genes reguladores desses processos. Embora não haja disponível um *status* global mutacional da linhagem UMSCC-1, a linhagem FaDu possui diversas mutações em genes que regulam a proliferação celular (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>) [54,55].

Nossos resultados também apontam a regulação pelo gene *HOXC13* no mecanismo de EMT, pois sua expressão reduzida levou a um aumento significativo do marcador epitelial CDH1 e a uma redução do marcador mesenquimal VIM na linhagem UMSCC-1 (Fig. 12), sinalizando ativação da EMT. Já na linhagem FaDu,

observamos somente uma queda na expressão de VIM (Fig. 12). Em adição a esses resultados, observamos também que HOXC13 poderia regular diretamente os genes *SNAI2*, *TWIST1* e *TGFBR1* (Fig. 34). Além disso, ele pode regular direta e indiretamente outros genes envolvidos na regulação do mecanismo de EMT. Esses achados serão explorados futuramente para confirmação dessa hipótese.

Wang e colaboradores mostraram em seu trabalho que o aumento da expressão da proteína SNAI2 está relacionado à diminuição de CDH1 e ao aumento de VIM no câncer de língua, enquanto *Casas* e colaboradores demonstraram que a indução de SNAI2 pela proteína TWIST1 parece ser um gatilho de ativação da EMT em câncer de mama [56,57]. Tais estudos corroboram com nossos achados, em que o aumento da expressão do gene *HOXC13* pode promover a progressão tumoral pela indução da EMT pela ativação de SNAI2 e/ou TWIST1, moléculas conhecidas como repressoras de CDH1.

Para um entendimento mais amplo da atuação da proteína HOXC13 no câncer de cabeça e pescoço, investigamos e validamos alguns dos seus genes alvos tendo como ponto de partida os dados prévios obtidos pelo nosso grupo por análise *in silico*. Para a linhagem FaDu confirmamos a relação de genes alvos de HOXC13 para os oito genes analisados, validando assim os dados *in silico*.

A análise da expressão dos genes alvos foi realizada para confirmar, ou não, a correlação positiva com o gene *HOXC13*, como havia sido sugerido a análise de bioinformática. De 8 genes analisados, cinco foram confirmados em uma ou ambas linhagens.

Os genes *ARHGEF18* e *PARD3* confirmaram a correlação positiva para ambas as linhagens, e o primeiro confirmou ser alvo de HOXC13 na linhagem FaDu. O gene *ARHGEF18*, também conhecido como P114-RhoGEF, atua como um fator de troca de nucleotídeo de guanina regulando um amplo espectro de funções celulares, como rearranjos do citoesqueleto, crescimento celular, motilidade e a ativação das proteínas Rho GTPases [58]. Esse fator já foi apontado como regulador da migração celular em câncer de mama através da fosforilação da cadeia leve da miosina nas junções celulares, e sua alta expressão em câncer de pulmão foi associada a um pior prognóstico e aumento de metástases para nódulos de linfonodos [59, 60]. Já a proteína PARD3 é um membro da família de proteínas PARD. Os membros desta família interagem com outros membros da família PARD e outras proteínas; elas

afetam a divisão celular assimétrica, direcionam o crescimento celular polarizado e parece desempenhar um papel central na formação de junções compactas epiteliais [61]. O gene *PARD3* foi relacionado como um supressor tumoral nos cânceres de pulmão, esôfago, glioma e próstata [62-64]. Entretanto, ele também já foi apontado como um importante fator de iniciação tumoral através da sua interação com a tirosina fosfatase Shp2 no câncer de próstata [65].

A análise de enriquecimento de vias biológicas com os alvos de HOXC13 demonstrou que estes têm uma participação na regulação da via de sinalização de TGF- β e no mecanismo de EMT. PARD3 forma um complexo proteico com as proteínas PARD6 e aPKC. Esse complexo está localizado junto as junções compactas das células epiteliais. Após a estimulação pelo TGF- β , os receptores de TGF- β 1 e 2 fosforilam o complexo PARD6-PARD3-aPKC, que, uma vez ativado pode atuar de duas formas: (1) ativando a proteína SMURF1 que promove a ubiquitinação da GTPase RhoA - proteína importante para a manutenção e organização do citoesqueleto e junções celulares; e/ou (2) ativando a proteína ARHGEF18 que atua na ativação da RhoA, esta por sua vez, também tem a função de ativar a proteína ROCK, uma proteína quinase associada a Rho. A proteína ROCK já foi apontada como reguladora da metástase pela desregulação do citoesqueleto de actina e aumento da desorganização da matriz extracelular, que geralmente está associada ao câncer [66-71]. O esquema abaixo resume tais resultados e propõe um modelo da atuação dos alvos de HOXC13 na regulação do mecanismo de EMT (Fig. 35).

Figura 35. **Vias sugeridas de atuação dos genes alvos do HOXC13 na EMT.** Imagem representativa. Em vinho: alvo direto do HOXC13 (ARHGEF18); em roxo: alvos indiretos do HOXC13 (TGFBR1 e PARD3). Setas em azul: sugestão de via (1); setas em preto: sugestão de via (2). Fonte: esta dissertação.

Os genes alvos *EIF4B* e *PIK3CD* apresentaram correlação positiva com o gene *HOXC13* na linhagem UMSCC-1. A proteína EIF4B é um fator de iniciação da tradução eucariótica que tem por função regular o estágio de iniciação da síntese de proteínas e o recrutamento do mRNA para o ribossomo [72]. Estudos demonstraram expressão elevada de EIF4B em câncer de pulmão, neuroblastoma e linfoma, levando a um aumento da tradução do proto-oncogene c-MET [73-75].

A proteína PIK3CD é uma isoforma delta da fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) e tem a função de converter PIP2 em PIP3 e disparar cascatas de transdução de sinal da via PI3K-Akt [58,76]. No câncer de colorretal, a expressão de PIK3CD aumenta a atividade de Akt, a translocação nuclear de β -catenina e a atividade transcrricional de TCF, além de diminuir da atividade de GSK-3 β , levando a uma maior proliferação e invasão celular [77].

Ambos os genes enriqueceram vias biológicas ligadas ao processo de proliferação celular, como a via de mTOR e a via PI3K-Akt. A via de mTOR está

envolvida na iniciação da tradução de proteínas necessárias para o crescimento celular, metabolismo e progressão do ciclo celular; e a via de PI3K-Akt é fundamental para a sobrevivência da célula em situações de estresse celular em tumores, causado por um fornecimento limitado de nutrientes e oxigênio, bem como pelo baixo pH [78,79]. Ambas as vias estão tão interligadas em seus papéis biológicos, que poderiam ser consideradas uma única via [80]. A relação íntima dessas vias se dá da seguinte forma: após a ativação de receptores tirosina-quinase (RTKs) pela ligação de fatores de crescimento, há a ativação de PIK3 (podendo ser o PIK3CD), que atua convertendo PIP2 a PIP3 em conjunto com PDK1, essa conversão ativa a Akt que inibe Tsc2. Com a inibição de Tsc2 há também a inibição de RheB, que, ausente, permite a ativação da via de mTOR. Uma vez ativada, a via de mTOR atua ativando ou inibindo diversas moléculas, uma delas é a proteína ribossomal S6K, que uma vez ativada, tem por função regular outras proteínas ribossomais, como EIF4B. Como já relatado acima, o EIF4B participa do processo de tradução, e além disso, está diretamente envolvido com a expressão do proto-oncogene c-MET, um receptor do fator de crescimento de hepatócito, que já foi relatado como regulador *upstream* da via PI3K-Akt/mTOR, sugerindo um circuito de retroalimentação [81,82] (Fig 36).

Figura 36. **Via sugerida de atuação dos genes alvos do HOXC13 na proliferação celular.** Imagem representativa. Em vinho: alvos direto do HOXC13 (PIK3CD e EIF4B); Setas contínuas: sugestão de via; seta pontilhada: sugestão de retroalimentação. Fonte: esta dissertação.

Outro gene que apresentou correlação positiva foi o gene *ALKBH8* para a linhagem FaDu, além de ter sido confirmado como alvo de HOXC13 pela técnica da ChIP. Curiosamente este gene não estava presente em nenhuma via enriquecida. O gene *ALKBH8* codifica uma proteína metiltransferase envolvida em uma variedade de funções biológicas, como reparo de DNA, metabolismo de diferentes tipos de RNA, desmetilação de histonas, além de participar do metabolismo de ácidos graxos [83]. A alta expressão de *ALKBH8* foi relatada como promotora do crescimento e progressão do câncer de bexiga devido a regulação positiva da expressão de Survivina, um inibidor de apoptose [84]. *Pilžys* e colaboradores também encontraram uma alta

expressão de ALKBH8 e de outros membros da família ALKBH em câncer de cabeça e pescoço [85]. Levando em consideração que ALKBH8 é um alvo do fator de transcrição HOXC13, podemos sugerir que o HOXC13 pode inibir a apoptose em câncer de cabeça e pescoço através da regulação direta de ALKBH8 e indireta de Survivina, contribuindo assim para a sobrevivência e crescimento tumoral.

Já os genes *LAMA3* e *TJP1*, diferentemente do que esperávamos, segundo os dados de bioinformática, apresentaram correlação negativa para o gene *HOXC13*, sendo *LAMA3* com valor significativo para a linhagem UMSCC-1 e *TJP1* para a linhagem FaDu. *LAMA3* é a subunidade α da glicoproteína extracelular Laminina, que é composta por mais duas subunidades: β e γ . Ela é encontrada na membrana basal e está envolvida na manutenção dos processos de diferenciação, migração e adesão celular [86]. Não há muitos estudos funcionais mostrando o papel do *LAMA3* em tumores, mas há relatos da ausência de expressão dessa subunidade em câncer de ovário associado com um pior prognóstico para os pacientes com esse perfil [87,88]. Já a proteína TJP1, também conhecida como ZO-1, é uma proteína que compõe as junções compactas. Ela atua como um *scaffold* para outras proteínas da junção compacta conectando-as ao citoesqueleto de actina [89]. *Martin* e colaboradores, em uma revisão sobre a atuação das proteínas das junções compactas nos cânceres, mostraram que a redução da expressão de TJP1 (ZO-1) foi amplamente relatada em câncer de mama, e que na sua ausência acarreta a perda da adesão célula-célula, colaborando para um perfil mais migratório e invasivo do tumor. Eles também apresentaram estudos que reportaram a ausência de TJP1 em câncer de esôfago e colorretal [90]. Essa perda da expressão de TJP1, e consequentemente um aumento do perfil invasivo do tumor, também foi relatada em câncer de fígado e de laringe [91,92]. Sendo assim, a correlação negativa de expressão desses dois genes e o gene *HOXC13* sugere uma regulação negativa, levando a inibição de expressão de *LAMA3* e *TJP1* pelo *HOXC13*, e consequentemente a um aumento da capacidade migratória e invasiva do câncer de cabeça e pescoço.

O único alvo confirmado que não apresentou correlação positiva, nem negativa com o gene *HOXC13*, foi o gene *PFDN1*, que codifica uma proteína do tipo chaperona, pertencente à família das Prefoldinas. As prefoldinas atuam principalmente sobre o dobramento de proteínas do citoesqueleto, como actina [93]. Apesar da regulação positiva desta proteína ter sido relacionada com o aumento da EMT em câncer

colorretal, de pulmão e gástrico, através da reorganização do citoesqueleto, inibição da Ciclina A e ativação da via Wnt/ β -catenina, respectivamente [94-96], não podemos afirmar que PFDN1 atue no câncer de cabeça e pescoço pela regulação de HOXC13. Talvez, apesar de ser um alvo deste fator de transcrição, sua expressão e função não seja afetada neste tumor pelo HOXC13.

Os genes *MYH10* e *PRKCA* confirmaram serem alvos do HOXC13 na linhagem FaDu, mas não tiveram sua correlação de expressão validada. O gene *MYH10* codifica a proteína Miosina-10, também conhecida como cadeia pesada da miosina 10 ou miosina IIB não-muscular, é uma proteína fundamental para a manutenção da morfologia, adesão, migração e divisão celular [97]. Na literatura, sua alta expressão em glioma foi relacionada a uma maior migração e invasão celular, através da regulação da via Wnt/ β -catenina [98]. Já o gene *PRKCA* codifica a proteína quinase C α , membro da família das proteínas quinases serina-treonina, e está envolvida na regulação da proliferação celular, apoptose, diferenciação, migração, hipertrofia cardíaca e inflamação [99]. Sua expressão elevada foi associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de pulmão e esôfago [100,101]. Contudo, apesar de serem alvos do HOXC13, não podemos concluir que *MYH10* e *PRKCA* tenham um papel relevante no câncer de cabeça e pescoço, dado a ausência de correlação de expressão entre eles e gene *HOXC13*.

Mudanças nos perfis de migração e de proliferação são fenótipos comumente encontrados em células tumorais, e alterações do ciclo celular seriam uma marca registrada do desenvolvimento do tumor. Ao nosso conhecimento, apresentamos aqui pela primeira vez evidências do envolvimento do gene *HOXC13* com o processo de migração, invasão celular, bem como sua possível regulação nas vias de ciclo celular e EMT.

Analisados em conjunto, os dados obtidos pelo nosso grupo sugerem fortemente a ligação do fator de transcrição HOXC13 tanto na migração quanto na proliferação de células tumorais oriundas de câncer de cabeça e pescoço, o que nos leva a propor que HOXC13 desempenharia um papel significativo na patogênese do câncer de cabeça e pescoço.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que o fator de transcrição HOXC13 pode desempenhar um papel importante na progressão do câncer de cabeça e pescoço, através da regulação positiva de processos biológicos centrais da proliferação celular, pela regulação direta e/ou indireta de genes alvos, como o ciclo celular e a via de sinalização PI3K-Akt-mTOR.

O mecanismo de EMT também se mostrou regulado pelo *HOXC13* direta e/ou indiretamente pela regulação de seus genes alvos, e conseqüentemente de outras vias biológicas envolvidas neste processo, como por exemplo a via do receptor de TGF- β . De modo geral, a capacidade migratória e invasiva de células tumorais é ditada pelo perfil de expressão geral de genes relacionados a estas características.

Os dados apresentados neste trabalho, em conjunto com outros achados do nosso grupo, reforçam a importância do estudo do papel dos genes da família HOX, assim como de seus genes alvos e de vias celulares especialmente relacionadas com a biologia no câncer de cabeça e pescoço. Os resultados do presente estudo serão usados pelo grupo para subsidiar sua continuidade e podem ser utilizados futuramente para embasar o descobrimento de novos biomarcadores de prognósticos e no emprego de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço.

7. REFERÊNCIAS

1. Head and Neck Cancers foi originalmente publicado por National Cancer Institute (2020). NCI Head and Neck Cancer Homepage: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#how-common-are-head-and-neck-cancers/>
2. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.
4. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009.
5. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018.
6. Bridges CB, Morgan TH. The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. The Lord Baltimore Press, 1923.
7. Mcginnis W, Levine MS, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature*, 1984.
8. Scott MP, Weiner AJ. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984.
9. Duboule D, Baron A, Mahl P, Galliot B. A new homeo-box is present in overlapping cosmid clones which define the mouse *Hox-1* locus. *EMBO*, 1986.
10. Hart CP, Awgulewitsch A, Fainsod A, Mcginnis W, Ruddle FH. Homeo box gene complex on mouse chromosome 11: molecular cloning, expression in embryogenesis, and homology to a human homeo box locus. *Cell*, 1985.

11. Scott MP, Weiner AJ, Hazelrigg TI, Polisky BA, Pirrotta V, Scalenghe F, Kaufman TC. The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell*, 1983.
12. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature*, 2010.
13. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol*. 2005.
14. Goodman FR. Congenital abnormalities of body patterning: embryology revisited. *Lancet*, 2003.
15. Zakany D, Zakany J. The role of Hox genes during vertebrate limb development. Elsevier, 2007.
16. Nunes FD, de Almeida FC, Tucci R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras*. 2003.
17. Pearson JC, Lemons D, Mcguinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature*, 2005.
18. Jung C, Kim RS, Lee SJ, Wang C, Jeng MH. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4. *Cancer Res*. 2004.
19. Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007.
20. Li B, Huang Q, Wei GH. The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression. *Cancers (Basel)*. 2019.
21. Brotto DB, Siena ÁDD, de Barros II, Carvalho SDCES, Muys BR, Goedert L, Cardoso C, Praça JR, Ramão A, Squire JA, Araujo LF, Silva WAD Jr. Contributions of HOX genes to cancer hallmarks: Enrichment pathway analysis and review. *Tumour Biol*. 2020.
22. Abate-Shen, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*, 2002.
23. Hershko AY, Kafri T, Fainsod A, Razin A. Methylation of HoxA5 and HoxB5 and its relevance to expression during mouse development. *Gene*, 2003.
24. Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2007.
25. Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI, Heidecke CD, Lerch MM, Bagowski CP. Retinoic acid receptor (RAR) antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behaviour of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2009.

26. Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, Erfurth FE, Eaton K, Lu J, Grimes HL, Chen J, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood*, 2009.
27. Sessa L, Breiling A, Lavorgna G, Silvestri L, Casari G, Orlando V Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human HOXA cluster. *RNA*, 2007.
28. Sasaki YT, Sano M, Kin T, Asai K, Hirose T. Coordinated expression of ncRNAs and HOX mRNAs in the human HOXA locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007.
29. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 2007.
30. de Barros E Lima Bueno R, Ramão A, Pinheiro DG, Alves CP, Kannen V, Jungbluth AA, de Araújo LF, Muys BR, Fonseca AS, Praça JR, Panepucci R, Neder L, Saggiaro FP, Mamede RC, Figueiredo DL, Silva WA Jr. HOX genes: potential candidates for the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* 2016.
31. Pádua Alves C, Fonseca AS, Muys BR, de Barros E Lima Bueno R, Bürger MC, de Souza JE, Valente V, Zago MA, Silva WA Jr. Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines. *Stem Cells.* 2013.
32. Aguiar, GM. Análise in vitro do papel dos genes HOXA10, HOXC9, HOXC10 e HOXC13 na tumorigênese do câncer de cabeça e pescoço. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso – Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Molecular e Tecnológica) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.
33. Zhang, B., Kirov, S.A., Snoddy, J.R. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W741-748.
34. Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., Zhang, B. (2013). WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res*, 41 (Web Server issue), W77-83.
35. Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M., & Zhang, B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research*.
36. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a

- knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Version 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005.
37. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003.
 38. Xia J, Gill EE, Hancock RE. NetworkAnalyst for statistical, visual and network-based meta-analysis of gene expression data. *Nat Protoc*. 2015.
 39. Geneious Prime 2019.2.1.0 (<https://www.geneious.com>)
 40. UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002.
 41. Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>)
 42. Bi Y, Guo S, Xu X, Kong P, Cui H, Yan T, Ma Y, Cheng Y, Chen Y, Liu X, Zhang L, Cheng C, Xu E, Qian Y, Yang J, Song B, Li H, Wang F, Hu X, Liu X, Niu X, Zhai Y, Liu J, Li Y, Cheng X, Cui Y. Decreased ZNF750 promotes angiogenesis in a paracrine manner via activating DANCER/miR-4707-3p/FOXC2 axis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis*. 2020.
 43. How to Analyse ChIP qPCR Data publicado por TTB – Top Tip Bio Homepage: <https://toptipbio.com/analyse-chip-qpcr-data>.
 44. Serafim, RB. Investigação do mecanismo de ação da HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) no reparo de DNA em células de glioblastoma. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2018.
 45. Orlando, V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*. 2000.
 46. Kuo MH, Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in a chromatin environment. *Methods*, 1999.
 47. Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D. Soutoglou, E, Talianidis, I. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter. *Cell*, 2000.
 48. Soutoglou E, Talianidis I. Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*, 2002.
 49. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein

- BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 2007.
50. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolzheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 2006.
 51. Yao Y, Luo J, Sun Q, Xu T, Sun S, Chen M, Lin X, Qian Q, Zhang Y, Cao L, Zhang P, Lin Y. HOXC13 promotes proliferation of lung adenocarcinoma via modulation of CCND1 and CCNE1. *Am J Cancer Res*. 2017.
 52. Kasiri S, Ansari KI, Hussain I, Bhan A, Mandal SS. Antisense oligonucleotide mediated knockdown of HOXC13 affects cell growth and induces apoptosis in tumor cells and over expression of HOXC13 induces 3D-colony formation. *RSC Adv*. 2013.
 53. Luo J, Wang Z, Huang J, Yao Y, Sun Q, Wang J, Shen Y, Xu L, Ren B. HOXC13 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma via repressing transcription of CASP3. *Cancer Sci*. 2018.
 54. Cancer Cell Line Encyclopedia Consortium & Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Consortium. Pharmacogenomic agreement between two cancer cell line data sets. *Nature*. 2015.
 55. Barretina, J. et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012.
 56. Wang C, Liu X, Huang H, Ma H, Cai W, Hou J, Huang L, Dai Y, Yu T, Zhou X. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2012.
 57. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*. 2011.
 58. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016.
 59. Terry SJ, Elbediwy A, Zihni C, Harris AR, Bailly M, Charras GT, Balda MS, Matter K. Stimulation of cortical myosin phosphorylation by p114RhoGEF drives cell migration and tumor cell invasion. *PLoS One*. 2012.

60. Song C, Gao Y, Tian Y, Han X, Chen Y, Tian DL. Expression of p114RhoGEF predicts lymph node metastasis and poor survival of squamous-cell lung carcinoma patients. *Tumour Biol.* 2013.
61. Bonastre E, Verdura S, Zondervan I, Facchinetti F, Lantuejoul S, Chiara MD, Rodrigo JP, Carretero J, Condom E, Vidal A, Sidransky D, Villanueva A, Roz L, Brambilla E, Savola S, Sanchez-Cespedes M. PARD3 Inactivation in Lung Squamous Cell Carcinomas Impairs STAT3 and Promotes Malignant Invasion. *Cancer Res.* 2015.
62. Wang L, Zhang H, Hasim A, Tuerhong A, Hou Z, Abdurahmam A, Sheyhidin I. Partition-Defective 3 (PARD3) Regulates Proliferation, Apoptosis, Migration, and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Med Sci Monit.* 2017.
63. Li J, Xu H, Wang Q, Fu P, Huang T, Anas O, Zhao H, Xiong N. Pard3 suppresses glioma invasion by regulating RhoA through atypical protein kinase C/NF- κ B signaling. *Cancer Med.* 2019.
64. Zhou PJ, Wang X, An N, Wei L, Zhang L, Huang X, Zhu HH, Fang YX, Gao WQ. Loss of Par3 promotes prostatic tumorigenesis by enhancing cell growth and changing cell division modes. *Oncogene.* 2019.
65. Zhang K, Zhao H, Ji Z, Zhang C, Zhou P, Wang L, Chen Q, Wang J, Zhang P, Chen Z, Zhu HH, Gao WQ. Shp2 promotes metastasis of prostate cancer by attenuating the PAR3/PAR6/aPKC polarity protein complex and enhancing epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene.* 2016.
66. Schmitz AA, Govek EE, Böttner B, Van Aelst L. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res.* 2000.
67. Sahai E, Marshall CJ. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol.* 2002.
68. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* 2005.
69. Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A. Regulation of ROCK activity in cancer. *J Histochem Cytochem.* 2013.
70. Zihni C, Terry SJ. RhoGTPase signalling at epithelial tight junctions: Bridging the GAP between polarity and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015.
71. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019.
72. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, Guignard JC, Jacquemot-Perbal MC, Labarussias M, Leberre V, Malo A, Morel-Pair C, Mossafa H, Potier JC, Texier G, Viguié F, Yau Chun Wan-Senon S, Zasadzinski A, Dessen P. Atlas

- of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013.
73. Cao L, Wang F, Li S, Wang X, Huang D, Jiang R. PIM1 kinase promotes cell proliferation, metastasis and tumor growth of lung adenocarcinoma by potentiating the c-MET signaling pathway. *Cancer Lett.* 2019.
 74. Hänel L, Gosau T, Maar H, Valentiner U, Schumacher U, Riecken K, Windhorst S, Hansen NO, Heikau L, Wurlitzer M, Nolte I, Schlüter H, Lange T. Differential Proteome Analysis of Human Neuroblastoma Xenograft Primary Tumors and Matched Spontaneous Distant Metastases. *Sci Rep.* 2018.
 75. Kapadia B, Nanaji NM, Bhalla K, Bhandary B, Lapidus R, Beheshti A, Evens AM, Gartenhaus RB. Fatty Acid Synthase induced S6Kinase facilitates USP11-eIF4B complex formation for sustained oncogenic translation in DLBCL. *Nat Commun.* 2018.
 76. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2004.
 77. Chen JS, Huang JQ, Luo B, Dong SH, Wang RC, Jiang ZK, Xie YK, Yi W, Wen GM, Zhong JF. PIK3CD induces cell growth and invasion by activating AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2019.
 78. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006.
 79. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999.
 80. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 2014.
 81. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* 2020.
 82. Chen QY, Jiao DM, Wu YQ, Chen J, Wang J, Tang XL, Mou H, Hu HZ, Song J, Yan J, Wu LJ, Chen J, Wang Z. MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway. *Oncotarget.* 2016.
 83. RajECKA V, Skalicky T, Vanacova S. The role of RNA adenosine demethylases in the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019.
 84. Ohshio I, Kawakami R, Tsukada Y, Nakajima K, Kitae K, Shimanoe T, Saigo Y, Hase H, Ueda Y, Jingushi K, Tsujikawa K. ALKBH8 promotes bladder cancer growth and progression through regulating the expression of survivin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016.
 85. Pilżys T, Marcinkowski M, Kukwa W, Garbicz D, Dylewska M, Ferenc K, Mieczkowski A, Kukwa A, Migacz E, Wołosz D, Mielecki D, Klungland A, Piwowarski J, Poznański

- J, Grzesiuk E. ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy. *Sci Rep*. 2019.
86. Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol*. 2004.
 87. Ying J, Wang J, Ji H, Lin C, Pan R, Zhou L, Song Y, Zhang E, Ren P, Chen J, Liu Q, Xu T, Yi H, Li J, Bao Q, Hu Y, Li P. Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene*. 2016.
 88. Tang L, Wang P, Wang Q, Zhong L. Correlation of LAMA3 with onset and prognosis of ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2019.
 89. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*. 1997.
 90. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2009.
 91. Zhang X, Wang L, Zhang H, Tu F, Qiang Y, Nie C. Decreased expression of ZO-1 is associated with tumor metastases in liver cancer. *Oncol Lett*. 2019.
 92. Qiu X, Wu Z, Wang X, Ma H, Zhang S, Wu H. Expression of ZO-1 in laryngeal squamous cell carcinoma and its prognostic value. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016.
 93. Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein HL, Cowan NJ. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell*. 1998.
 94. Wang P, Zhao J, Yang X, Guan S, Feng H, Han D, Lu J, Ou B, Jin R, Sun J, Zong Y, Feng B, Ma J, Lu A, Zheng M. PFDN1, an indicator for colorectal cancer prognosis, enhances tumor cell proliferation and motility through cytoskeletal reorganization. *Med Oncol*. 2015.
 95. Wang D, Shi W, Tang Y, Liu Y, He K, Hu Y, Li J, Yang Y, Song J. Prefoldin 1 promotes EMT and lung cancer progression by suppressing cyclin A expression. *Oncogene*. 2017.
 96. Zhou C, Guo Z, Xu L, Jiang H, Sun P, Zhu X, Mu X. PFND1 Predicts Poor Prognosis of Gastric Cancer and Promotes Cell Metastasis by Activating the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Onco Targets Ther*. 2020.
 97. Kim HT, Yin W, Jin YJ, Panza P, Gunawan F, Grohmann B, Buettner C, Sokol AM, Preussner J, Guenther S, Kostin S, Ruppert C, Bhagwat AM, Ma X, Graumann J, Looso M, Guenther A, Adelstein RS, Offermanns S, Stainier DYR. Myh10 deficiency leads to defective extracellular matrix remodeling and pulmonary disease. *Nat Commun*. 2018.
 98. Wang Y, Yang Q, Cheng Y, Gao M, Kuang L, Wang C. Myosin Heavy Chain 10 (MYH10) Gene Silencing Reduces Cell Migration and Invasion in the Glioma Cell Lines

- U251, T98G, and SHG44 by Inhibiting the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Med Sci Monit.* 2018.
99. Li L, Zhang L, Binkley PF, Sadee W, Wang D. Regulatory Variants Modulate Protein Kinase C α (PRKCA) Gene Expression in Human Heart. *Pharm Res.* 2017.
 100. Jiang H, Fu Q, Song X, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, Li C, Wang Y, Xue Y, Luo R, Fang W. HDGF and PRKCA upregulation is associated with a poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2019.
 101. Guo Y, Bao Y, Ma M, Zhang S, Zhang Y, Yuan M, Liu B, Yang Y, Cui W, Ansong E, Dong H, Macias V, Yang W. Clinical significance of the correlation between PLCE 1 and PRKCA in esophageal inflammation and esophageal carcinoma. *Oncotarget.* 2017.

8. REFERÊNCIAS DA TABELA 5

1. Li R, Ochs MF2, Ahn SM, Hennessey P, Tan M, Soudry E, Gaykalova DA, Uemura M, Brait M, Shao C, Westra W, Bishop J, Fertig EJ, Califano JA. Expression microarray analysis reveals alternative splicing of LAMA3 and DST genes in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014.
2. Pan Z, Li L, Fang Q, Zhang Y, Hu X, Qian Y, Huang P. Analysis of dynamic molecular networks for pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Cell Int*. 2018.
3. Ying J, Wang J, Ji H, Lin C, Pan R, Zhou L, Song Y, Zhang E, Ren P, Chen J, Liu Q, Xu T, Yi H, Li J, Bao Q, Hu Y, Li P. Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene*. 2016.
4. Wang Y, Yang Q, Cheng Y, Gao M, Kuang L, Wang C. Myosin Heavy Chain 10 (MYH10) Gene Silencing Reduces Cell Migration and Invasion in the Glioma Cell Lines U251, T98G, and SHG44 by Inhibiting the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Med Sci Monit*. 2018.
5. Bonastre E, Verdura S, Zondervan I, Facchinetti F, Lantuejoul S, Chiara MD, Rodrigo JP, Carretero J, Condom E, Vidal A, Sidransky D, Villanueva A, Roz L, Brambilla E, Savola S, Sanchez-Cespedes M. PARD3 Inactivation in Lung Squamous Cell Carcinomas Impairs STAT3 and Promotes Malignant Invasion. *Cancer Res*. 2015.
6. Wang L, Zhang H, Hasim A, Tuerhong A, Hou Z, Abdurahmam A, Sheyhidin I. Partition-Defective 3 (PARD3) Regulates Proliferation, Apoptosis, Migration, and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Med Sci Monit*. 2017.
7. Li J, Xu H, Wang Q, Fu P, Huang T, Anas O, Zhao H, Xiong N. Pard3 suppresses glioma invasion by regulating RhoA through atypical protein kinase C/NF- κ B signaling. *Cancer Med*. 2019.
8. Zhou PJ, Wang X, An N, Wei L, Zhang L, Huang X, Zhu HH, Fang YX, Gao WQ. Loss of Par3 promotes prostatic tumorigenesis by enhancing cell growth and changing cell division modes. *Oncogene*. 2019.
9. Bu Q, You F, Pan G, Yuan Q, Cui T, Hao L, Zhang J. MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD. *Biomed Pharmacother*. 2017.
10. Wang DC, Wang W, Zhu B, Wang X. Lung Cancer Heterogeneity and New Strategies for Drug Therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018.
11. Wang BD, Ceniccola K, Hwang S, Andrawis R, Horvath A, Freedman JA, Olender J, Knapp S, Ching T, Garmire L, Patel V, Garcia-Blanco MA, Patierno SR, Lee NH. Alternative splicing promotes tumour aggressiveness and drug resistance in African American prostate cancer. *Nat Commun*. 2017.
12. Chen JS, Huang JQ, Luo B, Dong SH, Wang RC, Jiang ZK, Xie YK, Yi W, Wen GM, Zhong JF. PIK3CD induces cell growth and invasion by activating AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling in colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2019.
13. Fu Q, Song X, Liu Z, Deng X, Luo R, Ge C, Li R, Li Z, Zhao M, Chen Y, Lin X, Zhang Q, Fang W. miRomics and Proteomics Reveal a miR-296-3p/PRKCA/FAK/Ras/c-Myc Feedback Loop Modulated by HDGF/DDX5/ β -catenin Complex in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017.

14. Hou Y, Pinheiro J, Sahm F, Reuss DE, Schrimpf D, Stichel D, Casalini B, Koelsche C, Sievers P, Wefers AK, Reinhardt A, Ebrahimi A, Fernández-Klett F, Pusch S, Meier J, Schweizer L, Paulus W, Prinz M, Hartmann C, Plate KH, Reifenberger G, Pietsch T, Varlet P, Pagès M, Schüller U, Scheie D, de Stricker K, Frank S, Hench J, Pollo B, Brandner S, Unterberg A, Pfister SM, Jones DTW, Korshunov A, Wick W, Capper D, Blümcke I, von Deimling A, Bertero L. Papillary glioneuronal tumor (PGNT) exhibits a characteristic methylation profile and fusions involving PRKCA. *Acta Neuropathol.* 2019.
15. Suwakulsiri W, Rai A, Xu R, Chen M, Greening DW, Simpson RJ. Proteomic profiling reveals key cancer progression modulators in shed microvesicles released from isogenic human primary and metastatic colorectal cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2018.
16. Jeong J, Choi J, Kim W, Dann P, Takyar F, Geftter JV, Friedman PA, Wysolmerski JJ. Inhibition of ezrin causes PKC α -mediated internalization of erbb2/HER2 tyrosine kinase in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2019.
17. Li Y, Luan C. PLCE1 Promotes the Invasion and Migration of Esophageal Cancer Cells by Up-Regulating the PKC α /NF- κ B Pathway. *Yonsei Med J.* 2018.
18. Li D, Hao X, Song Y. An integrated analysis of key microRNAs, regulatory pathways and clinical relevance in bladder cancer. *Onco Targets Ther.* 2018.
19. Ohshio I, Kawakami R, Tsukada Y, Nakajima K, Kitae K, Shimanoe T, Saigo Y, Hase H, Ueda Y, Jingushi K, Tsujikawa K. ALKBH8 promotes bladder cancer growth and progression through regulating the expression of survivin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016.
20. Cao L, Wang F, Li S, Wang X, Huang D, Jiang R. PIM1 kinase promotes cell proliferation, metastasis and tumor growth of lung adenocarcinoma by potentiating the c-MET signaling pathway. *Cancer Lett.* 2019.
21. Hänel L, Gosau T, Maar H, Valentiner U, Schumacher U, Riecken K, Windhorst S, Hansen NO, Heikau L, Wurlitzer M, Nolte I, Schlüter H, Lange T. Differential Proteome Analysis of Human Neuroblastoma Xenograft Primary Tumors and Matched Spontaneous Distant Metastases. *Sci Rep.* 2018.
22. Kapadia B, Nanaji NM, Bhalla K, Bhandary B, Lapidus R, Beheshti A, Evens AM, Gartenhaus RB. Fatty Acid Synthase induced S6Kinase facilitates USP11-eIF4B complex formation for sustained oncogenic translation in DLBCL. *Nat Commun.* 2018.
23. Zhang L, Feng T, Spicer LJ. The role of tight junction proteins in ovarian follicular development and ovarian cancer. *Reproduction.* 2018.
24. Xu X, Liu Z, Zhou L, Xie H, Cheng J, Ling Q, Wang J, Guo H, Wei X, Zheng S. Characterization of genome-wide TFCP2 targets in hepatocellular carcinoma: implication of targets FN1 and TJP1 in metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015.
25. Tsai KW, Kuo WT, Jeng SY. Tight Junction Protein 1 Dysfunction Contributes to Cell Motility in Bladder Cancer. *Anticancer Res.* 2018.
26. Wang D, Shi W, Tang Y, Liu Y, He K, Hu Y, Li J, Yang Y, Song J. Prefoldin 1 promotes EMT and lung cancer progression by suppressing cyclin A expression. *Oncogene.* 2017.
27. Wang P, Zhao J, Yang X, Guan S, Feng H, Han D, Lu J, Ou B, Jin R, Sun J, Zong Y, Feng B, Ma J, Lu A, Zheng M. PFDN1, an indicator for colorectal cancer prognosis, enhances tumor cell proliferation and motility through cytoskeletal reorganization. *Med Oncol.* 2015.

28. Guo Y, Chen JX, Yang S, Fu XP, Zhang Z, Chen KH, Huang Y, Li Y, Xie Y, Mao YM. Selection of reliable reference genes for gene expression study in nasopharyngeal carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*. 2010.
29. Terry SJ, Elbediwy A, Zihni C, Harris AR, Bailly M, Charras GT, Balda MS, Matter K. Stimulation of cortical myosin phosphorylation by p114RhoGEF drives cell migration and tumor cell invasion. *PLoS One*. 2012.
30. Song C, Gao Y, Tian Y, Han X, Chen Y, Tian DL. Expression of p114RhoGEF predicts lymph node metastasis and poor survival of squamous-cell lung carcinoma patients. *Tumour Biol*. 2013.

9. APÊNDICE A

9.1. Resultado da imunoprecipitação da cromatina na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.

- Origem *in silico*: ChIP-seq

Figura 1. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *ALKBH8*. Fonte: esta dissertação.

Figura 2. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *ARHGEF18*. Fonte: esta dissertação.

Figura 3. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *EIF4B*. Fonte: esta dissertação.

Figura 4. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PFDN1*. Fonte: esta dissertação.

Figura 5. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *TJP1*. Fonte: esta dissertação.

- **Origem *in silico*: predição de motif**

Figura 6. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *MYH10*. Fonte: esta dissertação.

Figura 7. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PIK3CD*. Fonte: esta dissertação.

Figura 8. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem FaDu transfectada com vetor pOZ vazio.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PRKCA*. Fonte: esta dissertação.

10. APÊNDICE B

10.1. Resultado da imunoprecipitação da cromatina na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOXC13-HA.

Figura 1. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOXC13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *ALKBH8*. Fonte: esta dissertação.

Figura 2. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOXC13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *ARHGEF18*. Fonte: esta dissertação.

Figura 3. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOX13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *EIF4B*. Fonte: esta dissertação.

Figura 4. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOX13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *MYH10*. Fonte: esta dissertação.

Figura 5. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOX13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PFDN1*. Fonte: esta dissertação.

Figura 6. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOX13-HA. A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PIK3CD*. Fonte: esta dissertação.

Figura 7. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOX13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *PRKCA*. Fonte: esta dissertação.

Figura 8. **Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)-qPCR na linhagem UMSCC-1 superexpressando a proteína HOX13-HA.** A análise RT-qPCR foi realizada com DNA imunoprecipitado usando *primers* desenhados para a região reguladora do gene *TJP1*. Fonte: esta dissertação.

11. ANEXO

11.1. Parecer da Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 03 de Janeiro de 2020.

O projeto de pesquisa intitulado: “**Avaliação do papel do gene HOXC13 na regulação da proliferação e migração em câncer de cabeça e pescoço**” em nome de **Graziela de Moura Aguiar**, supervisionado pela Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr. da Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto, foi avaliado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2019.002-02**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório anual da pesquisa.

Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

11.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Ribeirão Preto, 22 de julho de 2019

Ilustríssima Senhora

Prof.^a Dr.^a Márcia Guimarães Villanova

MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

Eu, Graziela de Moura Aguiar, mestranda do Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), orientada pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior (FMRP-USP), venho, por meio desta, solicitar a dispensa de análise do CEP do meu projeto de pesquisa, intitulado "Avaliação do papel do gene HOXC13 na regulação da proliferação e migração celular em câncer de cabeça e pescoço".

O projeto de pesquisa, cujo resumo segue em anexo, tem empregado como material de estudo linhagens celulares humanas, que foram adquiridas de empresas da área de biologia molecular. As linhagens celulares são amplamente utilizadas na pesquisa biológica e para tais não é requerido aprovação de comitê de ética. Esclareço que a natureza da solicitação de dispensa neste momento é exclusivamente devido às documentações exigidas pela FAEPA para a concessão de auxílio para participação em eventos.

Atenciosamente,

Graziela de Moura Aguiar

GRAZIELA DE MOURA AGUIAR

Não há necessidade de submissão ao
Comitê de Ética em Pesquisa:

Marcia Villanova
Dr.^a Márcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCFMRP-USP
22.07.2019