UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS
TRONCO E TERAPIA CELULAR

JESSICA RODRIGUES PLAÇA

**Avaliação do perfil genômico dos genes da família HOX em tumores a partir de
dados de bancos públicos**

Ribeirão Preto
2017

JESSICA RODRIGUES PLAÇA

Avaliação do perfil genômico dos genes da família HOX em tumores a partir de dados de bancos públicos

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))

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 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.

Ribeirão Preto

2017

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.

Rodrigues Praça, Jessica

Avaliação do perfil genômico dos genes da família HOX em tumores a partir de dados de bancos públicos. / Jessica Rodrigues Praça; orientador, Wilson Araujo da Silva Junior. – 2017.

94f.:il; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásicas;

Orientador: Araujo da Silva Junior, Wilson

1. Genes HOX. 2. Câncer. 3. Bioinformática. 4. Carcinogênese.

Nome: PLAÇA, Jessica Rodrigues

Título: Avaliação do perfil genômico dos genes da família HOX em tumores a partir de dados de bancos públicos

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

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Agostinho e Lucia, principalmente por me darem amor incondicional. Vocês sempre me apoiam em meus ideais, me ajudam a tomar decisões de forma consciente e nunca mediram esforços para tornar meus sonhos possíveis. Sou eternamente grata à vocês.

Aos meus irmãos, Desirée e Alex, companheiros de uma vida e que hoje me inspiram à ser uma pessoa melhor.

Ao meu noivo Lucas por todo amor e cumplicidade que compartilha comigo todos os dias. Você fornece apoio fundamental aos meus objetivos e sou eternamente grata por todo cuidado e carinho que você tem comigo.

À minha família pela torcida, apoio e incentivo aos meus objetivos.

Aos meus amigos, Aline, Aila, Yago, Emily, Gabriela e Matheus pelos conselhos e companheirismo mesmo distantes.

À Joselita que me acolheu com muito carinho em Ribeirão Preto e aos colegas da pensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr, que me acolheu em seu laboratório sem ao menos me conhecer. O senhor confiou em meu trabalho e me ajudou a desenvolver meu pensamento científico.

Ao Prof. Dr. Israel Tojal da Silva por se disponibilizar em colaborar na construção do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB), pelas ótimas discussões científicas, convivência e boas risadas.

Aos colaboradores em bioinformática do LGMB que a partir de diferentes desafios me ajudaram a acumular conhecimentos de diversas áreas da bioinformática.

À secretária do programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Adriana, que sempre foi muito prestativa e não mediu esforços para me ajudar em processos administrativos.

Ao Programa de Oncologia Clínica Células Tronco e Terapia Celular da FMRP, à Fundação Hemocentro da FMRP, aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por toda infraestrutura, auxílio administrativo e financeiro a mim concedido.

RESUMO

PLAÇA, Jessica Rodrigues. **Avaliação do perfil genômico dos genes da família HOX em tumores a partir de dados de bancos públicos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2017.

A família de genes HOX compreende um conjunto de fatores de transcrição altamente conservados evolutivamente. Em mamíferos, os genes HOX se subdividem em 4 clusters: HOXA, HOXB, HOXC e HOXD, atuando no desenvolvimento embrionário com a regulação de processos biológicos como proliferação, diferenciação, migração, angiogênese e apoptose que são reativados durante a carcinogênese. Estudos recentes apontam que os genes HOX podem exercer papel relevante na formação de diversos tumores sólidos, todavia ainda não foi possível caracterizar sistematicamente a expressão dos genes HOX em tumores bem como determinar seus alvos em tumores. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho consistiu na caracterização *in silico* do modelo de atuação genes HOX na carcinogênese. Para cumprir este objetivo foi identificado o perfil diferencial dos genes HOX entre amostras normais e tumorais. Alvos de genes HOX foram identificados e, quando diferencialmente expressos, foram associados com os genes HOX, independentemente dos índices de metilação e CNA. Por fim, as associações finais entre os genes HOX e seus alvos foram enriquecidas com os bancos de dados KEGG e GO. Identificou-se diferentes assinaturas de expressão de genes HOX em diferentes tumores, associadas com o eixo ântero-posterior do corpo humano, bem como os folhetos embrionários originários aos tecidos tumorais, compatível com o padrão de expressão no desenvolvimento embrionário. Um número considerável de genes HOX atuam preferencialmente via *enhancers* na regulação de seus alvos. Como exemplo, os genes HOXB7 e HOXC11, que funcionam como moduladores anti tumorais. Finalmente, o estudo mostra que diante do número crescente de dados genômicos públicos, é possível viabilizar projetos de grande valor científico.

Palavras-chave: Genes HOX. Câncer. Bioinformática. Carcinogênese.

ABSTRACT

PLAÇA, Jessica Rodrigues. **Genomic profile evaluation of HOX genes family in cancer using public databases**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2017.

The HOX gene family comprises a set of evolutionarily highly conserved transcription factors. In mammals, HOX genes are subdivided into four clusters: HOXA, HOXB, HOXC and HOXD, acting on the embryonic development with regulation of biological processes such as proliferation, differentiation, migration, angiogenesis and apoptosis that are reactivated during carcinogenesis. Recent studies indicate that HOX genes may play a relevant role in the formation of several solid tumors, but it has not been possible to systematically characterize the expression of HOX genes in tumors as well as to determine their targets in tumors. Thus, the general aim of this project was to characterize the *in vivo* model of HOX genes in carcinogenesis. To accomplish this goal the differential profile of HOX genes was identified between normal and tumor samples. HOX gene targets were identified and, when differentially expressed, were associated with HOX genes regardless of methylation and CNA indices. Finally, the final associations between the HOX genes and their targets were enriched with the KEGG and GO databases. Different signatures of HOX gene expression were identified in different tumors, associated with the anteroposterior axis of the human body, as well as the embryonic leaflets originating from the tumor tissues, compatible with the expression pattern in the embryonic development. A considerable number of HOX genes preferentially act via enhancers in the regulation of their targets. As an example, the HOXB7 and HOXC11 genes, which function as pro-tumor modulators. Finally, the study shows that in view of the growing number of public genomic data, it is possible to make feasible projects of great scientific value.

Keywords: HOX genes. Cancer. Bioinformatics. Tumorigenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conservação entre os grupos de genes HOM-C e HOX. Os quatro grupos de genes HOX encontrados em mamíferos são conservados do complexo *Drosophila* Hom-C quanto a sua sequência nucleotídica e expressão colinear. Durante o desenvolvimento embrionário, os genes são expressos em um padrão que correlaciona com o posicionamento cromossômico. Os genes 3' são expressos anteriormente aos genes da posição 5'. Adaptado de (Lappin et al., 2006) 15

Figura 2. Representação do workflow da análise desenvolvida neste trabalho. 38

Figura 3. Heatmap dos valores de fold-change em log2 que possuem valores de $p \geq 0.01$ da expressão dos genes HOX a partir da análise comparativa entre amostras normais e tumorais. Os genes e os tumores estão hierarquicamente agrupados pelo método de ward.D2 a partir da Correlação de Pearson. As porcentagens de tumores com super expressão e baixa expressão para cada HOX estão representadas em vermelho e verde, respectivamente, ao lado dos genes HOX. As porcentagens de HOX super expressos e menos expressos para cada tumor estão representadas em vermelho e verde, respectivamente, ao lado dos tumores. 44

Figura 4. Dendograma com valores de fold-change da expressão dos genes HOX a partir da análise comparativa entre amostras normais adjacentes ao tumor e tumorais. A) Agrupamento por gene HOX. B) Agrupamento por tumor. As caixas vermelhas representam os dois agrupamentos significativos identificados. AU representa valores aproximadamente imparciais dos p-valores e BP representa a probabilidade de determinado agrupamento após o Bootstrap padrão. 46

Figura 5. Características dos picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB. A) Número de picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX. B) Tamanho dos picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX. 47

Figura 6. Características dos picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB após o filtro de qualidade e de interseção com sítios de hipersensibilidade a DNase do ENCODE. A) Número de picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX. B) Tamanho dos picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento 48

realizado com os genes HOX.

48

Figura 7. Porcentagem dos picos em posições genômicas. A) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB. B) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB após o filtro de qualidade e de interseção com sítios de hipersensibilidade a DNase do ENCODE.

49

Figura 8. Distribuição da frequência de picos próximos ao TSS. A) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB. B) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB após o filtro de qualidade e de interseção com sítios de hipersensibilidade a DNase do ENCODE.

50

Figura 9. Oncoprint com a expressão e CNA dos genes HOX em cinco linhagens celulares do CCLE em que foram realizados experimentos de CHIP-seq.

51

Figura 10. Ideograma com a localização cromossômica dos alvos de genes HOX identificados pela metodologia de CHIP-seq. Cada ponto representa um alvo identificado por essa metodologia.

52

Figura 11. Picos de ligação de 23 genes HOX na região promotora do gene MTRNR2L1 do genoma referência GRCh38. A região completa dos picos está marcada em laranja.

53

Figura 12. Motivos de ligação de HOX ao DNA identificados a partir de sequências do CHIP-seq. As linhagens dos genes HOX que possuem experimentos diferentes dos realizados em LoVo estão indicados nas legendas.

54

Figura 14. Ideograma com a localização cromossômica dos alvos de genes HOX identificados pela busca de motivos. Cada ponto representa um alvo identificado por essa metodologia.

56

Figura 15. Diagrama de Venn com número de alvos identificados pelas metodologias de CHIP-seq, escaneamento de motivos e alvos já descritos na literatura.

57

Figura 16. Número de alvos de todos os genes HOX de acordo com o tipo gênico.

57

Figura 17. Heatmap dos valores de correlação de HOX com seus alvos (R). Quadrantes pretos podem representar correlações que não são significativas, alvos que não foram considerados como diferencialmente expressos em determinado tumor ou que o valor de R absoluto é menor que 0.2.

61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes HOX descritos na literatura com expressão alterada em tumores em comparação aos seus tecidos normais.	29
Tabela 2. Número de amostras utilizadas nos diferentes estudos desse trabalho por cada tipo tumoral	37
Tabela 3. Número de alvos de HOX identificados na Literatura, pelas metodologias de CHIP-seq, escaneamento de motivos e de alvos que foram identificados em pelo menos duas metodologias das três metodologias.	58

LISTA DE SIGLAS

A-P	Ântero-posterior
BED	<i>Browser Extensible Data</i>
CHIP-seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
CNA	<i>Copy Number Alteration</i>
CPM	Contagens Por Milhão
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNase	Desoxirribonuclease
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
HOX	Homeobox
MET	Metilação de DNA
pb	pares de base
PcG	Policombo
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesenquima
TPM	Transcritos Por Milhão
TrxG	Trithorax
TSS	<i>Transcript Start Site</i>
RARE	Elemento responsivo ao ácido retinóico
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-seq	<i>Ribonucleic Acid Sequencing</i>
RP	Razão de Probabilidades
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleo proteins</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Genes HOX	14
1.2 Genes HOX e o desenvolvimento de vertebrados	15
1.3 Regulação dos genes HOX	17
1.4 Genes HOX e interação com DNA	20
1.5 O câncer	22
1.6 Alvos dos genes HOX e regulação de processos biológicos	24
1.7 Genes HOX em tumores	27
1.8 Genômica aplicada à função dos genes HOX em tumores	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material	35
3.2. Métodos	37
3.2.1 Abordagem in silico para identificação de genes diferencialmente expressos	38
3.2.2 Análise de associação dos genes HOX	39
3.2.5 Abordagem in silico para identificar alvos dos genes HOX	39
3.2.6 Análise estatística usada para associação entre os genes HOX e seus alvos nos tumores	42
3.2.7 Frequência de recorrência de alvos dos genes HOX nos tumores	43
3.2.8 Enriquecimento de vias e ontologias biológicas	43
4.3.2 Alvos identificados pela busca de motivos	54
4.3.3 Análise comparativa dos alvos identificados	56
4.4 Caracterização de alvos de HOX na modulação de cânceres	59

4.5 Análise de alvos de HOX em vias e processos associados ao câncer	63
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Genes HOX

Os genes Homeobox (HOX) são fatores de transcrição que especificam vários aspectos da morfogênese animal, como a identidade posicional ao longo do eixo Ântero-posterior (A-P), havendo uma relação entre o arranjo cromossômico dos genes HOX e a presença da sua expressão (Lewis, 1978). Eles foram descobertos a partir da observação de duas mutações na mosca de fruta *Drosophila melanogaster*. Mutações no complexo de genes *Antennapedia* (ANT-C), composto por 5 genes (*Labial* (lab), *Proboscipedia* (pb), *Deformed* (Dfd), *Sex combs reduced* (Scr) e *Antennapedia* (Antp)), fizeram com que as antenas fossem transformadas em pernas, enquanto mutações no complexo de genes *Bithorax* (BX-C), composto por 3 genes (*Ultrabithorax* (Ubx), *abdominal-A* (Abd-A), e *Abdominal-B* (Abd-B)), transformaram o haltere (órgão de equilíbrio no terceiro segmento torácico) em uma parte da asa. Estas alterações foram descritas como transformações homeóticas da palavra grega *homeosis*, significando uma mudança de estrutura corporal completa para outra (Gehring, 1987).

Os genes Homeobox estão presentes nos genomas de todos os animais descritos, bem como nos genomas de plantas e fungos, indicando que as origens são antigas e precedem a divergência desses reinos. Acredita-se que os *clusters* de BX-C e ANT-C de *Drosophila* surgiram pela duplicação em tandem de um único gene, seguido pela duplicação dos *clusters* em vertebrados (Schughart et al., 1989; Duboule, 1992).

Em humanos, os quatro grupos de genes HOX (A, B, C e D) são localizados em diferentes cromossomos, 7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31, respectivamente. Cada *cluster* consiste em 13 grupos de genes parálogos com nove a onze membros atribuídos a partir da semelhança de suas sequências genômicas e posição relativa dentro do *cluster*, totalizando 39 genes (Scott, 1992). Um alto grau de homologia é evidente entre os genes HOX humanos e os genes Hom-C de *Drosophila* (Figura 1). Assim, os grupos parálogos humanos HOX1-8 são estreitamente relacionados com *Antennapedia* (Antp), enquanto os grupos HOX9-13 são mais relacionados ao *abdominal-B* (abd-B) (Ruddle et al., 1994).

Figura 1. Conservação entre os grupos de genes HOM-C e HOX. Os quatro grupos de genes HOX encontrados em mamíferos são conservados do complexo *Drosophila* Hom-C quanto a sua sequência nucleotídica e expressão colinear. Durante o desenvolvimento embrionário, os genes são expressos em um padrão que correlaciona com o posicionamento cromossômico. Os genes 3' são expressos anteriormente aos genes da posição 5'. Adaptado de (Lappin et al., 2006)

1.2 Genes HOX e o desenvolvimento de vertebrados

Em embriões murinos, os genes HOX são primeiramente expressos durante o início da gastrulação (dia 07), no estágio que o embrião gera seu principal eixo do corpo (Deschamps e Wijgerde, 1993; Forlani et al., 2003). Ao longo do tempo, os genes HOX são sequencialmente ativados a partir da sua ordem cromossômica e os transcritos codificados pelo último grupo, HOX13, podem ser detectados em torno do dia 09, ou seja, dois dias após o início da ativação (Deschamps e Wijgerde, 1993;

Kmita e Duboule, 2003; Deschamps e Van Nes, 2005). Esta progressão transcricional, chamada de colinearidade temporal, se estende por vários dias (Duboule, 1994). Na mesoderme pré-somítica, esta ativação sequencial precisa ser coordenada com a produção tempo-sequencial de segmentos corporais (o "relógio de segmentação") (Pourquie, 2003) de modo que os somitos produzidos mais recentes adquiram identificadores genéticos distintos (Dubrulle et al., 2001; Spitz et al., 2001). Em seguida, os vários estados da atividade dos genes HOX são aperfeiçoados e memorizados, levando em última instância a domínios ao longo do eixo rostral ao caudal, onde podem ser observados conjuntos parcialmente sobrepostos de produtos de HOX, fenômeno conhecido como colinearidade espacial. Como resultado, os genes localizados nas posições 3' (por exemplo, HOX3-4) são transcritos quase ao longo de todo o eixo embrionário, incluindo o mesoderma da placa lateral, mesoderma paraxial e tubo neural, enquanto que os genes localizados nas posições 5' (HOX10-11) são ativos no tronco posterior e os HOX13 apenas na ponta da cauda (Deschamps et al., 1999; Kmita e Duboule, 2003; Deschamps e Van Nes, 2005), como é possível observar na Figura 1.

O tempo de ativação dos genes HOX no desenvolvimento é funcionalmente importante uma vez que experimentos resultantes na ativação prematura ou retardada dos genes HOX demonstraram produzir alterações fenotípicas, mesmo em casos que os padrões finais de expressão de HOX são preservados (Gerard et al., 1997; Zakany et al., 1997; Kondo e Duboule, 1999; Juan e Ruddle, 2003). Este fato é consistente com a existência de atividades funcionais associadas as fases precoce e tardia da expressão do gene HOX de vertebrados (Carapuco et al., 2005). Também sugere-se que durante o início do desenvolvimento dos vertebrados o estado de repressão geral dos genes HOX mantém elementos de regulação em um "estado silencioso" e que só depois que a repressão global desses genes é removida que esses elementos se tornam acessíveis à transcrição e, portanto, funcionais (Tschopp e Duboule, 2011).

Além de definir a identidade de posição ao longo do eixo Ântero-posterior, os genes HOX também definem padrões de desenvolvimento de diversas estruturas especializadas, como os membros de vertebrados. Durante o desenvolvimento de membros de galinha, pelo menos 23 genes HOX são expressos (Nelson et al., 1996). Foi encontrado um padrão de expressão dos genes do *cluster* HOXA, como

por exemplo os genes HOXA9-11 expressos nos membros inferiores, onde se desenvolveram o rádio, tíbias e fíbula. Os genes HOXA9-13 expressos no pulso (ou no tornozelo) e nos dedos. Um padrão de expressão semelhante foi encontrado para os genes HOXD, enquanto a expressão do *cluster* HOXC foi mais complexa. Os genes 3' do *cluster* C (HOXC4 e HOXC5) foram encontrados apenas nos membros anteriores, enquanto os genes 5' (HOXC9 e HOXC10) foram encontrados apenas nos membros posteriores. Os genes HOXC6 e HOXC8 foram encontrados em ambos os membros.

Evidências de várias fontes também demonstraram papéis múltiplos para genes HOX durante o desenvolvimento pulmonar. Os genes 3' dos *clusters* HOXA e HOXB são os mais expressos nos pulmões em desenvolvimento tanto em humanos quanto em camundongos (Nelson et al., 1996; Golpon et al., 2001). A hibridização *in situ* de pulmões de pintinho demonstrou um padrão aninhado de expressão de genes HOXB, com as partes distais do trato respiratório tendo progressivamente mais genes HOX expressos. Enquanto que o HOXB5 é expresso em todo o pulmão e as vias aéreas, a expressão de HOXB9 é restrita aos sacos de ar mais distais. A expressão de vários dos genes altamente expressos de HOX no pulmão fetal diminui com o avanço da gestação (Bogue et al., 1994), consistente com o papel hipotético desses genes, particularmente o HOXB5, na regulação da morfogênese de ramificação, que ocorre na vida fetal precoce (Volpe et al., 2003). O HOXA5 diminui significativamente durante o desenvolvimento do pulmão e permanece altamente expresso nos pulmões dos animais recém nascidos, sugerindo que os genes HOX têm diferentes papéis na regulação da maturação pulmonar (Bogue et al., 1994). Os ratos com mutação nula de HOXA5 morrem no parto com a falta de surfactante pulmonar, indicando um papel para este gene HOX na função das células epiteliais alveolares do tipo II (Aubin et al., 1997).

1.3 Regulação dos genes HOX

A ativação e transcrição coordenada dos genes HOX demonstra ser essencial para o correto funcionamento e efeito biológico dessa família gênica, dessa maneira a regulação desses *clusters* gênicos necessita ser altamente refinada. Nesse contexto, o principal mecanismo de regulação baseia-se em uma transição na estrutura da cromatina, desde um estado inicialmente reprimido até uma

configuração progressivamente aberta para transcrição, exercendo uma ativação coordenada (Dolle et al., 1989). Essa regulação epigenética é efeito da atividade dos complexos modificadores de cromatina Policombo (PcG) e Trithorax (TrxG). Esses dois grupos modificadores atuam de maneiras opostas, onde o complexo Trithorax é necessário para manter a transcrição dos genes HOX em células que a transcrição já foi iniciada, enquanto o complexo PcG mantém o estado reprimido dos genes por ligação e condensação da cromatina (Schwartz e Pirrotta, 2007). A atuação do complexo PcG está associada a marca de repressão H3K27me3 (trimetilação da lisina 27 da histona H3), enquanto o complexo TrxG está correlacionado a marca de ativação H3K4me3 (trimetilação da lisina 4 da histona H3).

A importância dessa regulação sobre os genes HOX foi demonstrada com as observação da perda progressiva de H3K27me3, concomitantemente ao ganho de H3K4me3 que resultou na ativação sequencial dos genes HOXD durante a extensão do eixo principal do camundongo (Soshnikova e Duboule, 2009). Portanto, nota-se que a ativação transcricional dos HOXD segue uma janela de transição entre as duas marcas epigenéticas que se desloca juntamente ao tempo de atuação dos genes HOXD, de uma extremidade do *cluster* a outra. Ainda, foi demonstrado que a separação pela metade do *cluster* HOXD, observado em camundongos geneticamente modificados, não altera a deposição inicial da marcação H3K27me3, mas a integridade do *cluster* é requerida para a consolidação e manutenção da repressão sobre o complexo gênico, o qual parece exercer um efeito sinérgico devido a densidade dos genes HOX. De forma semelhante, a marcação inicial H3K4me3 não é afetada pela integridade do *cluster* HOXD, entretanto a coordenação de mudanças das marcações H3K4me3 é alterada, pois é observado um sinal prematuro de H3K4me3 nas regiões onde os *clusters* foram cortados no camundongo geneticamente modificado. Diante disso, observou-se que o balanço do padrão de ganho de marcações H3K4me3 e a concomitante perda de H3K27me3, depende parcialmente da própria disposição dos genes HOX em seu *cluster* (Soshnikova e Duboule, 2009).

Os mecanismos para modulação da metilação das histonas é fortemente dependente da atuação dos RNAs longos não codificantes (lncRNAs). Entre eles está o lncRNA Hoxb5/b6as pertencente ao grupo de RNAs antisense que é transcrito da região que compreende os genes Hoxb5 e Hoxb6. Mais precisamente, Hoxb5/

b6as exerce regulação dos genes HOX através da interação com a histona metiltransferase MLL1 na modulação da marca H3K4m3, levando a ativação e manutenção da expressão de HOXB5 e HOXB6 em corpos embrionários murinos (Dinger et al., 2008). A modulação do estado da cromatina nos loci HOX, também é influenciada por outro lncRNA. O HOTTIP é transcrito da região 5' do HOXD13, na posição oposta (Wang et al., 2011). A atividade de HOTTIP em células humanas está envolvida na interação com a proteína WDR5, a qual recruta o complexo TrxG para introduzir as marcas H3K4m3 na indução de transcrição dos genes HOXA (Wang et al., 2011). Além do HOTTIP e Hoxb5/b6as, o lncRNA HOTAIR também exerce regulação sobre os genes HOX. HOTAIR é transcrito a partir da região entre os genes HOXC11 e HOXC12 humanos (Rinn et al., 2007). HOTAIR interage com a proteína PRC2 (complexo PcG repressivo 2), constituinte do complexo principal PcG, e é requerido para a ocupação e trimetilação H3K27 do locus HOXD, intermediando a modulação da transcrição desse locus.

Apesar do conhecimento avançado da influência da metilação em histonas na regulação dos genes HOX, a metilação do DNA até o momento foi pouco estudada. Sabe-se que há uma tendência de hipermetilação dos genes HOX, onde a metilação gênica dos HOXA5 e HOXB5 após o nascimento é necessária para o completo silenciamento desses genes (Hershko et al., 2003). Em células humanas representando fases de diferenciação celular (célula tronco embrionária, fibroblasto diferenciado derivado de célula tronco embrionária e fibroblasto de neonatos), os *clusters* HOX representam os genes mais hipometilados do genoma em célula tronco embrionárias. Em contrapartida, os genes HOX encontram-se altamente metilados em fibroblastos de neonatos, indicando que sua metilação aumenta gradativamente com o processo de diferenciação (Laurent et al., 2010).

A expressão de HOX também é controlada por hormônios endócrinos durante a embriogênese. Dentro desse contexto, a regulação entre ácido retinóico e os genes HOX é dinâmica e envolve um sistema de regulação retroalimentativo. O ácido retinóico atua via seus receptores cognatos que compreendem duas famílias, RAR e RXR, que são membros da superfamília do receptor nuclear ativado por ligante (Daftary e Taylor, 2006). O complexo de RAR regula os genes alvos por ligação ao *enhancer* RARE ou RXRE (elemento responsivo ao ácido retinóico). Os RAREs foram encontrados em 5 regiões regulatórias de três genes HOX (HOXA1, HOXB1 e

HOXD4) (Daftary e Taylor, 2006). Em embriões murinos pre-segmentados, o ácido retinóico induz a expressão de RARbeta que, por seguinte, ativa a expressão de HOXB4 e HOXD4. Em contrapartida, esses genes HOX modulam a expressão de RARbeta, restringindo-a para uma localização mais posterior (Serpente et al., 2005).

1.4 Genes HOX e interação com DNA

Os genes HOX de mamíferos contém dois éxons e um único intron que varia de 200 pb até milhares de pb. O domínio proteico homeobox que se liga ao DNA está sempre presente dentro do segundo exon e detém um alto grau de homologia entre os genes HOX, especialmente dentro dos grupos parálogos (Egger et al., 1994). O homeodomínio é um motivo altamente conservado de 60 aminoácidos e sua função foi sugerida por sua semelhança à sequência gênica de proteínas reguladoras que contém um motivo de ligação ao DNA *helix-turn-helix*. O homeodomínio pode ser dividido em três regiões helicoidais: a Hélice 3, que possui o maior contato com o DNA e as Hélices 1 e 2 que ficam acima do DNA. O restante do contato do homeodomínio com o DNA é feito pelo braço N-terminal (Berger et al., 2008; Noyes et al., 2008).

Embora as proteínas HOX possam se ligar ao DNA através do homeodomínio, essa ligação é pouco específica uma vez que geralmente envolve apenas o reconhecimento de uma sequência de 4 pb (TAAT). Uma maior especificidade é conferida, especialmente, pela ligação de uma classe de proteínas que possuem um homeodomínio TALE (Extensão do Loop de Três Aminoácidos) a um pentâmero à montante do homeodomínio. Essas proteínas são os cofatores de HOX e em *Drosophila* constituem as proteínas Extradenticle (Exd) e Homothorax (Hth), enquanto em vertebrados constituem os grupos de genes PBX (Pbx1, Pbx2, Pbx3, Pbx4) e MEIS (Meis1, Meis2, Meis3, Prep1, and Prep2) (Longobardi et al., 2014), respectivamente. O último liga-se preferencialmente à proteínas HOX9-13 (Williams et al., 2005), enquanto os membros da família PBX se ligam preferencialmente à proteínas HOX1-11 (Piper et al., 1999; Allen et al., 2000; Brendolan et al., 2005).

Além de aumentar a complexidade da sequência de ligação ao DNA, os cofatores também desempenham um papel na regulação pós-traducional facilitando a entrada de proteínas HOX no núcleo (Morgan et al., 2017) e influenciam os principais eventos transcrpcionais como o recrutamento da RNA polimerase II ou III,

ou inibidores da transcrição, como HDAC. Por exemplo, o HOXC6 pode recrutar a RNA polimerase II através de um sítio TAAT no promotor do gene S100B para promover sua transcrição em linhagens celulares de neuroblastoma (Zhang et al., 2007), enquanto o HOXD3 precisa se ligar como um heterodímero com PBX1B para recrutar a RNA polimerase II e ativar a transcrição do gene ITGB3, codificando a Integrina β 3, durante a angiogênese (Charboneau et al., 2005). Por outro lado, HOXB6 e HOXD4 podem se ligar e inibir a histona acetil transferase CBP do *enhancer* de TWIST1, reprimindo a transcrição de TWIST1 (Shen et al., 2001).

Alguns dos genes PBX em vertebrados produzem múltiplas isoformas através de *splicing* alternativo (Monica et al., 1991; Milech et al., 2001; Wagner et al., 2001). Usando o ensaio com leveduras híbridas, mostrou-se algumas evidências de que um subconjunto de isoformas têm habilidades distintas para interagir com MEIS1, MEIS2A e PREP1 (Milech et al., 2001). Tais diferenças também podem ser importantes para a especificidade HOX e podem refletir no arranjo dos sítios de ligação de HOX e TALE nos elementos cis-regulatórios.

Além das proteínas com homeodomínio da família TALE, a proteína Engrailed (EN) de *Drosophila* também mostrou ser um cofator de HOX (Gebelein et al., 2004). EN ligado conjuntamente à UBX e ABD-A a um elemento regulador do gene Dll é necessário para a repressão Dll nos compartimentos posteriores dos segmentos abdominais (Gebelein et al., 2004; Gebelein e Mann, 2007). Ao contrário dos cofatores TALE, que normalmente atuam com as proteínas HOX como ativadores ou repressores dos genes alvos, é provável que o dímero de EN com HOX seja mais envolvido na repressão gênica devido à capacidade de EN se vincular diretamente ao co-repressor Groucho (Jiménez et al., 1997).

Um subconjunto de fatores de transcrição contendo dedos de zinco, especificamente o Teashirt (TSH) de *Drosophila*, também foi sugerido como cofator de HOX (Robertson et al., 2004; Taghli-Lamalle et al., 2007). Todavia, esse fator não parece exibir a mesma atividade que normalmente é observada entre os fatores TALE e as proteínas HOX. No único alvo em que os sítios de ligação TSH foram identificados, os sítios de ligação de TSH não são adjacentes ao HOX (Taghli-Lamalle et al., 2007). Assim, neste momento prefere-se classificar esses fatores de dedos de zinco como colaboradores de HOX, que fornecem insumos essenciais e adicionais para um subconjunto de elementos cis regulados por HOX (Mann et al.,

2009).

Os genes HOX, como já relatado no texto, podem atuar como recrutadores de complexos co-ativadores, co-repressores e/ou de remodelação de cromatina que, em última instância, realizam regulação transcricional. Há numerosos trabalhos que descrevem as interações diretas entre as proteínas HOX e/ou os cofatores TALE com componentes mais gerais da maquinaria transcricional, como *enhancers* (Chariot et al., 1999; Saleh et al., 2000; Shen et al., 2004; Prince et al., 2008). Os *enhancers* são regiões do DNA que facilitam o recrutamento dessa maquinaria transcricional para a região promotora do gene a ser transcrito. Em alguns casos, os domínios de ativação e repressão foram mapeados em proteínas HOX (Rambaldi et al., 1994; Zhao et al., 1996; Tour et al., 2005) e considerados essenciais para a especificidade celular (Sorge, Ha, Polychronidou, Friedrich, Bezdan, Kaspar, et al., 2012). Em larvas de *Drosophila*, para entender a especificidade HOX, foi estudado como os genes HOX regulam os *enhancers* para alcançar um padrão específico de tricomas epidérmicos ao longo do eixo A-P. Para tanto foi utilizado o gene *Shavenbaby* (svb) que é um dos principais controladores do desenvolvimento dos tricomas (Chanut-Delalande et al., 2006). Os *enhancers* de svb foram regulados diretamente pelo Ubx, a partir de agrupamentos de sítios de ligação Ubx-Exd de baixa afinidade no mesmo *enhancer*. A especificidade é codificada por sítios de baixa afinidade e os agrupamentos homotípicos destes sítios fornecem robustez regulatória ao HOX. Esta arquitetura geral - agrupamentos homotípicos de sítios de ligação de baixa afinidade - é conservada evolutivamente e pode fornecer um mecanismo geral para conciliar a necessidade de especificidade e robustez do *enhancer* (Crocker et al., 2015). Além disso, modificações covalentes, como a fosforilação, também demonstraram influenciar as atividades de HOX (Jaffe et al., 1997; Berry e Gehring, 2000; Galant e Carroll, 2002; Ronshaugen et al., 2002; Taghli-Lamalle et al., 2008).

1.5 O câncer

O câncer é um conjunto de doenças que resultam da proliferação exacerbada e descontrolada de uma população clonal de células que adquiriram mudanças genéticas, genômicas ou epigenômicas. O processo de desenvolvimento e estabelecimento do câncer, referido como carcinogênese, apresenta uma série de

mudanças e características comuns a cânceres que acometem diferentes tecidos. Uma maneira de descrever este processo é ilustrar as características essenciais das células cancerosas e dos tumores conhecidas como as "marcas do câncer" (*Hallmarks of Cancer*). O desenvolvimento do câncer fundamenta-se em seis propriedades principais: proliferação auto-suficiente, insensibilidade aos sinais anti proliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, ativação de invasão e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

A proliferação auto-suficiente, a característica principal do câncer, pode ser alcançada de diversas maneiras, sendo através da produção de fatores de crescimento auto-ligantes (Goustin et al., 1986); pela estimulação de células normais do estroma a liberar fatores pró-mitóticos (Kawada et al., 2015); pela super expressão de receptores mitogênicos na superfície celular, permitindo uma hipersensibilidade à fatores proliferativos (Chettouh et al., 2013); e através da independência da necessidade de estimulação externa através da aquisição de mutações genéticas que induzem a ativação constitutiva de vias proliferativas (Dhomen et al., 2009).

Além da capacidade proliferativa, as células tumorais apresentam uma insensibilidade à fatores antiproliferativos que se dão principalmente através: de mutações, deleções ou silenciamento epigenético de supressores tumorais (Kazanets et al., 2016)(Berggren et al., 2003); da perda de atividade desse supressores proliferativos que pode ocorrer através da diminuição de tradução de suas respectivas proteínas devido a super expressão de microRNAs que tem como alvo o mRNA dessas fatores (Rather et al., 2013); e pela redução de ancoramento de receptores na superfície celular capazes de induzir a parada do estímulo de proliferação pelo contato célula-a-célula (Stockinger et al., 2001).

Para sustentar uma alta capacidade proliferativa a célula tumoral ainda precisa se evadir de estímulos de morte celular programada. Os principais mecanismos para essa evasão ocorre através da perda dos sensores celulares que induziriam esse processo biológico, como por exemplo a deleção do gene CDKN2A (Berggren et al., 2003); através da redução de expressão de fatores apoptóticos (Matsuura et al., 2017); e pela estabilização e super expressão proteínas anti-apoptóticas (Liu et al., 2005).

A característica de potencial replicativo ilimitado, um fator determinante que

permite a proliferação exacerbada, baseia-se principalmente na reativação da telomerase, enzima responsável pela manutenção dos tamanhos dos telômeros (Akincilar et al., 2016). Ainda há mecanismos de prolongamento dos telômeros que não dependem da telomerase, conhecidos como ALT (alongamento alternativo dos telômeros) baseado na recombinação homóloga de fragmentos de DNA que são mais comuns em sarcomas (Bojovic et al., 2015).

Após o tumor ter se estabelecido, o ganho de massa tumoral exige um maior fornecimento de nutrientes, processo idealizado pela angiogênese. Nesse contexto de formação de novos vasos sanguíneos, há a super expressão de fatores pró-angiogênicos como VEGF-A e FGF (Carmeliet, 2005), e eventualmente, a perda de expressão de inibidores desse processo como TSP-1 (Yano et al., 2005).

Após a formação de novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral, os processos de invasão e metástase são facilitados. Tal etapa é caracterizada pela perdas de junções célula-célula, através do silenciamento de proteínas essenciais para esse processo como a E-caderina (Fan et al., 2012). A perda dessas junções é etapa inicial para o processo de Transição Epitélio-Mesenquima (TEM), etapa na qual as células epiteliais adquirirem características mesenquimais que auxiliarão a etapa de invasão e deslocamento para tecidos distantes (Gheldof e Berx, 2013).

1.6 Alvos dos genes HOX e regulação de processos biológicos

Enquanto os genes HOX foram identificados pela primeira vez como reguladores da formação do eixo A-P durante o desenvolvimento, sabe-se que os genes HOX também estão ativos em células adultas normais. Propõe-se que eles atuam como chave no controle da identidade celular e, como tal regulam genes que são necessários para divisão celular, adesão e migração celular, morfologia, diferenciação e apoptose, além de seus papéis durante a embriogênese (Svingen e Tonissen, 2006).

A morte celular programada (apoptose) é essencial para a organogênese e embriogênese. Um dos exemplos melhor caracterizados é a regulação da apoptose pelo gene HOX *Dfd* no embrião de *Drosophila*. *Dfd* exerce papel fundamental no desenvolvimento dos segmentos mandibular e maxilar, e dos dois lóbulos da parte posterior da cabeça que são separados por um sulco na epiderme (Lohmann et al., 2002). A correta formação desses elementos depende da ligação de *Dfd* no região

regulatória do gene pró-apoptótico Reaper (rpr), visto que embriões mutantes para Dfd apresentam excesso de células na região ventral entre os dois segmentos (mandibular e maxilar) e ausência de sulco entre eles, o que é reparado pela expressão ectópica de Dfd através de rpr (Lohmann et al., 2002). Já em modelos murinos, um exemplo clássico de regulação de morte celular programada mediada por HOX é a necessidade de apoptose para a separação dos dígitos nos membros vertebrados. Nesse contexto, camundongos deletados para HOXA13 apresentam menores níveis de morte celular e sindactilia, sendo esse feito devido a ausência de Aldh1a2, enzima que converte retinaldeído em ácido retinóico desencadeando uma sinalização para morte celular programada. Tal enzima é alvo do HOXA13 (Shou et al., 2013) que, conjuntamente aos demais alvos desse HOX, Bmp2 e Bmp7 (Knosp et al., 2004) modulam a separação interdigital.

No que tange a migração celular, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* é o melhor modelo para exemplificação da atuação dos genes HOX. Nesse contexto, foi identificado que o gene HOX LIN-39 induz a expressão de MIG-13 que codifica para uma proteína transmembrana necessária para a correta migração anterior dos neuroblastos QL e QR resultantes da divisão do neuroblasto Q (Clark et al., 1993). Em *C. elegans* selvagens para LIN-39 o neuroblasto QR migra anteriormente, enquanto que em mutantes para LIN-39 essa migração é inexistente (Clark et al., 1993), devido a falta de acúmulo de actina na parede anterior do neuroblasto induzido indiretamente por LIN-39 através de MIG-13 (Sym et al., 1999). Contrariamente, o gene HOX MAB-5, conjuntamente com a sinalização Wnt, reprime a expressão de MIG-13 para garantir a migração posterior do neuroblasto QL (Wang, Zhou, et al., 2013).

Os genes HOX e o processo de proliferação celular também são intimamente correlacionados. Em células mielomonocíticas, HOXA10 se liga ao promotor do inibidor quinase dependente de ciclina p21, conjuntamente com seus parceiros triméricos PBX1 and MEIS1 para bloquear o ciclo celular e induzir diferenciação (Bromleigh e Freedman, 2000). Em células Rat-1, HOXB4 induz proliferação através do controle da atividade de AP-1 que, por conseguinte, ativa ciclina D1 (Krosi e Sauvageau, 2000).

Em processos globais em mamíferos, como implantação do embrião, os genes HOX tem papel fundamental. Entre eles, HOXA10 é requerido para esse processo e

a expressão dele é regulado por hormônios esteróides. HOXA10 ativa IGFBP-1 em células de estroma no endométrio (Gao et al., 2002) em cooperação com FKHR (Kim et al., 2003). IGFBP-1 serve como modulador da proteína IGF na interação da decídua e invasão do trofoblasto, processo essencial para implantação embrionária (Fazleabas et al., 2004). Esse processo ainda é reforçado pela expressão de ITGB3 induzido por HOXA10 (Daftary et al., 2002).

Durante o desenvolvimento vascular e angiogênese, a etapa de diferenciação celular endotelial é requerida. O marcador inicial de células endoteliais FLK1 é transativado por HOXB5 (Wu et al., 2003), sendo a expressão do seu ligante VEGF induzido por HOXB7 (Care et al., 1996), fazendo com que esses genes HOX sejam essenciais para esse processo. Outros alvos de HOX na angiogênese foram identificados, como o receptor EphB4, pertencente a família dos receptores de tirosina quinase, que é ativado por HOXA9 na modulação da migração celular endotelial e formação do tubo (Bruhl et al., 2004). Outro membro da família das efrinas, EphA7 é ativada por HOXA13 e HOXD13, modulando o desenvolvimento do limbo em camundongos no processo de formação dos olhos (Salsi e Zappavigna, 2006).

A expressão de HOX é altamente associada a transição epitélio-mesênquima. A expressão ectópica de HOXA7 em células epiteliais da superfície ovariana, onde normalmente é ausente, induz a expressão de E-caderina e diminui a expressão de vimentina (marcador mesenquimal), aumentando o fenótipo epitelial (Naora et al., 2001). Conjuntamente ao HOXA7, o HOXA10 também exerce influência no fenótipo epitelial. HOXA10 é reprimido por metilação do promotor em carcinomas endometriais, correlacionando com estágios tumorais avançados. A expressão ectópica de HOXA10 inibe o comportamento invasivo e reduz a disseminação das células tumorais, através da repressão de Snail, resultando na expressão diminuída de E-caderina, elucidando um possível papel na inibição da transição epitélio-mesênquima (Yoshida et al., 2006).

Contrariamente, a superexpressão de HOXD3 em células de câncer de pulmão, induz um fenótipo mesenquimal com redução de E-caderina e níveis aumentados de integrina $\alpha 5$ - $\beta 3$, além de aumentar a produção de MMP-2 que resulta em um maior número de metástases *in vivo* (Hamada et al., 2001). Já em células mamárias, a expressão de HOXB7 induz fenótipo mesenquimal pela redução de E-caderina e

de proteínas de junção como claudina 1, claudina 4 e claudina 7 (Wu et al., 2006). De forma semelhante, a superexpressão de HOXB9 induz diversos fatores angiogênicos como VEGF, bFGF, IL-8, assim como ErbB, resultando em uma exacerbada motilidade celular e fenótipo mesenquimal. Tal modulação tem como efeito a formação de tumores altamente vascularizados que metastatizam para o pulmão in vivo (Hayashida et al., 2010). Tais observações sugerem que HOXD3, HOXB7 e HOXB9 servem como indutores da transição epitélio-mesênquima, opondo-se ao HOXA7 e HOXA10.

1.7 Genes HOX em tumores

É amplamente aceito que um dos principais modelos de carcinogênese é representado pela desregulação de processos que normalmente ocorrem durante a embriogênese e que, de alguma forma, passam a ser reativados durante o início do desenvolvimento tumoral (Abate-Shen, 2002). Dentre um vasto número de genes que regulam o crescimento e desenvolvimento embrionário, os genes da família HOX são repetidamente reportados como desregulados no câncer (Tabela 1).

Uma potencial função para os genes HOX em câncer se tornou aparente primeiramente pela presença frequente de fusões gênicas quiméricas oncogênicas que conduzem a formação de doenças malignas hematológicas (Alharbi et al., 2013). Um exemplo é a translocação t(7; 11) (p15; p15) na Leucemia Mielóide Aguda que resulta na fusão da proteína HOXA9 com NUP98 (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996). Em contraste com malignidades hematológicas, os mecanismos que causam a desregulação dos genes HOX em tumores sólidos são menos conhecidos.

Comumente associados como ativadores transcricionais, estudos com os genes HOX em cânceres individuais e/ou com aplicação de técnicas de pequena escala demonstraram que ambas as perdas ou ganhos de expressão estão associadas e são essenciais para diversos tipos de cânceres sólidos. Apenas alguns genes homeobox super expressos foram identificados em regiões que são amplificadas em tumores. O grupo de genes HOXB e o gene DLX4 localizam-se em uma região que é amplificada em ~10% dos cânceres de mama (Hyman et al., 2002). No entanto, HOXB7 e DLX4 são excessivamente expressos em > 50% dos cânceres de mama (Wu et al., 2006), indicando que a amplificação de genes não é o único mecanismo

subjacente super expressão desses genes.

Além disso, como pode-se observar, um único gene HOX pode ter associações inversas dependendo do tipo tumoral, como o caso do gene HOXA1 que em câncer de mama encontra-se com expressão reduzida, enquanto no câncer de próstata há uma super expressão do mesmo (Tabela 1). Demonstrando maior complexidade ainda, genes como HOXA5 e HOXC5, já foram descritos como sendo super expressos e reprimidos em estudos que utilizaram tecidos e linhagens celulares de câncer de mama (Tabela 1).

Diante disso, nota-se uma fina regulação da expressão dos genes HOX e sua função no câncer parece depender de um contexto muito específico da identidade tumoral. Visando uma explicação para tal fenômeno, dois principais mecanismos de desregulação da família HOX foram postulados (Abate-Shen, 2002): desregulação têmporo-espacial, e dominância gênica.

A desregulação têmporo-espacial envolve o conceito básico de expressão dessa família gênica, onde a regulação no tempo e no espaço são essenciais para o correto desenvolvimento de um órgão. Desse modo, o processo oncogênico pode ser correlacionado com uma alteração da organogênese e diferenciação tecidual, como exemplificado no estudo que identificou que os genes 5' HOX são mais expressos no câncer esofágico de célula escamosa, enquanto no tecido normal adjacente os genes 3' HOX eram predominantes (Takahashi et al., 2007).

O segundo mecanismo, dominância gênica, baseia-se na alta expressão de genes HOX normalmente ausentes no tipo tecidual acometido pelo câncer, sendo exemplificado por diversos estudos (Bhatlekar et al., 2014). Dentre esses exemplos está o HOXB5 que encontra-se super expresso em câncer de pulmão de células pequenas, sendo associado com proliferação, migração, invasão e fenótipo de TEM através da indução de β -catenina e seus alvos a jusantes c-Myc e ciclina D1 (Zhang et al., 2017). A influência dos genes HOX em determinados processos biológicos fisiológicos ainda exerce um efeito dose-dependente, como no caso do HOXA9 na hematopoiese, onde camundongos homo deletados para esse gene apresentam uma redução de 40% na formação de leucócitos e linfócitos, enquanto hemi deleções em HOXA9 não afetam a hematopoiese (Lawrence et al., 1997) (Lawrence et al., 1997). Isso demonstra que a expressão dos genes HOX tem uma precisa regulação durante a organogênese, onde pequenas alterações na transcrição

desses genes podem ser o suporte inicial para oncogênese, como no caso da super expressão do HOXA9 em leucemia mielóide aguda (Zhao et al., 2015), além de diversos outros cânceres (Tabela 1).

Tabela 1. Genes HOX descritos na literatura com expressão alterada em tumores em comparação aos seus tecidos normais.

Gene	Expressão	Câncer	Referência
HOXA1	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de próstata	Wang, H. et al., 2015
HOXA2	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
HOXA3	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
HOXA4	↑	Câncer de cólon	Bhatlekar et al., 2014
	↑	Carcinoma de ovário	Yamashita et al., 2006
HOXA5	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de mama	Raman et al., 2000
	↑	Adenocarcinoma de pulmão	Abe et al., 2006
	↑	Câncer esofágico escamoso	Zhang et al., 2017
	↓	câncer de pulmão de cél não-pequenas	Zhang et al., 2015
	↑	leucemia mieloide aguda	Zhao et al., 2015
HOXA6	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
HOXA7	↑	Câncer de ovário	Naora et al., 2001
HOXA9	↑	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Glioblastoma	Goncalves et al., 2015
	↑	Carcinoma ovariano	Cheng et al., 2005
	↑	Câncer de bexiga invasivo não-muscular	Kim et al. (2013)
	↓	Câncer cervical	Alvarado-Ruiz et al., 2016
	↑	Leucemia mieloide aguda	Zhao et al., 2015
HOXA10	↑	Adenocarcinoma de pulmao	Abe et al., 2006
	↑	Carcinoma de laringe de cél escamosas	De Barros et al., 2016
	↑	Glioblastoma	Murat et al., 2008
	↑	Carcinoma ovariano	Cheng et al., 2005
	↑	Câncer oral de cel escamosa	Carrera et al., 2015

HOXA11	↑	Carcinoma ovariano	Cheng et al., 2005
	↑	Câncer de bexiga	Cantile et al., 2003
	↑	Carcinoma renal	Cantile et al., 2011
	↓	Câncer de mama	Xia et al., 2017
HOXA13	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Câncer de tireóide	Cantile et al., 2013
	↑	Câncer bexiga	Hu et al., 2017
HOXB1	↑	Câncer de tireóide anaplásico	Takahashi et al., 2004
HOXB2	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Câncer cervical	Gonzalez-Herrera et al., 2015
HOXB3	↑	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↑	Câncer de próstata primário	Chen et al., 2013
	↑	Adenocarcinoma de pulmão	Bodey et al., 2000
HOXB4	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Adenocarcinoma de pulmão	Bodey et al., 2000
HOXB5	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Câncer de mama	Lee et al., 2015
	↑	Câncer gástrico	Hong et al., 2015
HOXB6	↑	Câncer de cólon	Vider et al., 2000
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
HOXB7	↑	Carcinoma de cólon	Liao et al., 2011
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
HOXB7	↑	Câncer de ovário	Yamashita et al., 2006
HOXB8	↑	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↑	Câncer de cólon	Vider et al., 2000
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
HOXB9	↑	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Câncer de tireóide anaplásico	Takahashi et al., 2004
HOXB13	↑	Câncer oral de cél escamosa	Xue et al., 2017
	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↑	Câncer de mama ER-positivo	Shah et al., 2013
	↑	Câncer de próstata	Zhang et al., 2014
	↑	Câncer de tireóide	Cantile et al., 2013

	↑	Câncer ovariano	Yamashita et al., 2006
	↑	Câncer de bexiga	Marra et al., 2013
HOXC4	↑	Câncer de próstata	Miller et al., 2003
	↑	Câncer de pulmão	Omatu, 1999
	↑	Câncer de bexiga	Cantile et al., 2003
HOXC5	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↓	Câncer de mama com mutação em TP53	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de próstata	Miller et al., 2003
	↑	Câncer de bexiga	Cantile et al., 2003
HOXC6	↑	Câncer de próstata	Miller et al., 2003
	↑	Câncer de próstata	Ramachandran et al., 2005
	↑	Adenocarcinoma de pulmão	Bodey et al., 2000
	↑	Câncer de bexiga	Cantile et al., 2003
	↓	Câncer ovariano seroso	Tait et al., 2015
	↑	Câncer gástrico	Zhang, Q. et al., 2013
HOXC8	↑	Câncer de cólon	Vider et al., 2000
	↑	Carcinoma de laringe de células escamosas	De Barros et al., 2016
	↑	Câncer de próstata	Miller et al., 2003
	↑	Câncer de pulmão	Omatu, 1999
HOXC9	↑	Câncer de cólon	Vider et al., 2000
	↑	Carcinoma de laringe de células escamosas	De Barros et al., 2016
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Câncer de pulmão	Omatu, 1999
	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2016
HOXC10	↑	Carcinoma de laringe de células escamosas	De Barros et al., 2016
HOXC11	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de bexiga	Cantile et al., 2003
	↑	Câncer de rim	Cantile et al., 2011
	↑	Melanoma	Cantile et al., 2012
HOXC13	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Carcinoma de laringe de células escamosas	De Barros et al., 2016
	↑	Câncer de pulmão	Omatu, 1999

	↑	Câncer de tireóide	Cantile et al., 2013
HOXD1	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
HOXD3	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de mama	Shaoqiang et al., 2013
HOXD4	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
HOXD8	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
HOXD8	↑	Câncer de mama	Hur et al., 2014
	↑	Câncer de pulmão	Omatu, 1999
	↓	Câncer colorretal	Mansour e Senga, 2017
HOXD9	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Glioma	Tabuse et al., 2011
HOXD10	↑	Câncer de cólon	Bhatlekar et al., 2014
	↑	Carcinoma de laringe de células escamosas	De Barros et al., 2016
	↓	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de pulmão	Omatu, 1999
HOXD11	↑	Câncer de bexiga	Cantile et al., 2003
	↑	Carcinoma de laringe de células escamosas	De Barros et al., 2016
	↑	Câncer de rim	Cantile et al., 2011
HOXD12	↓	Carcinoma de cólon	Kanai et al., 2010
	↑	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
HOXD13	↑	Câncer de mama	Makiyama et al., 2005
	↑	Câncer de tireóide	Cantile et al., 2013
	↓	Câncer de mama	Zhong et al., 2015

1.8 Genômica aplicada à função dos genes HOX em tumores

As tecnologias de alto rendimento, como microarranjos de DNA e sequenciamento de nova geração, oferecem uma grande perspectiva para identificar o perfil global de expressão e os alvos de fatores de transcrição em uma escala completa do genoma (Choo e Russell, 2011). Esses experimentos aliados à métodos para mapear a ocupação dos fatores de transcrição em todo o genoma pela imuno-

precipitação com cromatina (ChIP) ou para capturar a conformação cromossômica em um grande número de amostras podem ajudar nessa compreensão em um contexto dinâmico e na redução da variabilidade dos resultados.

Na técnica de CHIP-seq as células ou os tecidos são tratados com um agente químico, geralmente formaldeído, para reticular proteínas de forma covalente ao DNA. Isto é seguido por ruptura celular e sonicação, ou em alguns casos, digestão enzimática, para clivar a cromatina até um tamanho de 100-300 pb (Ren et al., 2000; Iyer et al., 2001). A proteína de interesse (fator de transcrição, histona modificada, RNA polimerase, etc.) com o seu DNA ligado é então enriquecida em conjunto com fragmentos de DNA por purificação com um anticorpo específico para a proteína. Alternativamente, as linhagens celulares que expressam um fator marcado com epítipo podem ser geradas e a proteína de fusão imuno-precipitada através do epítipo. Após o enriquecimento imunológico, as ligações cruzadas são revertidas e o DNA enriquecido é purificado e preparado para análise por sequenciamento de DNA de alto rendimento.

Já as técnicas de captura de conformação cromossômica são baseadas no princípio de que os fragmentos de restrição podem ser ligados quando próximos, independentemente da distância linear que os separa. Existem diferentes variações dessas técnicas, mas as etapas iniciais são as mesmas. É realizado um *cross-linking* da cromatina com formaldeído e o genoma é clivado com uma enzima de restrição. Os fragmentos são ligados em conjunto, levando a produtos de ligação entre fragmentos distantes do genoma linear. Para a técnica Hi-C, por exemplo, as extremidades de restrição são rotuladas usando nucleotídeos marcados com biotina (Lieberman-Aiden et al., 2009; Rodley et al., 2009; Duan et al., 2010). Após a ligação, purificação e cisalhamento, fragmentos ligados são selecionados com o uso de biotina e enfim sequenciados. Neste caso, uma matriz de frequências de contato entre todos os fragmentos de restrição no genoma podem ser construídas (Pueschel et al., 2016).

Uma variedade de estudos genômicos, principalmente em *Drosophila* e camundongos, foram publicados evidenciando os alvos potenciais dos genes HOX em escala genômica (Choo et al., 2011; Beh et al., 2016; Prasad et al., 2016). Em humanos, especificamente em câncer, poucos trabalhos até o momento identificaram potenciais alvos dos genes HOX, sendo esses dados explorados nos

genes HOXA9 (Huang et al., 2012), HOXB7 (Heinonen et al., 2015), HOXB13 (Stelloo et al., 2015) e HOXC9 (Wang, Choi, et al., 2013) pela metodologia de CHIP-seq. No entanto, mesmo para os genes HOXA9 e HOXB7 em que a expressão gênica em tumores hematopoiéticos e de mama foi utilizada de forma integrada aos dados de CHIP-seq, a comparação dos resultados com um tecido normal e o uso das informações de regiões regulatórias pelas técnicas de captura de conformação cromossômica que ajudam na identificação dos alvos de fatores de transcrição não foram efetuados. Assim caracteriza-se uma grande lacuna no conhecimento do modo de atuação dos genes HOX, especialmente na carcinogênese.

Além disso, embora tais tecnologias ofereçam cobertura abrangente do genoma, os genes HOX têm efeitos quantitativos diferentes que quando somados ao conjunto de diferentes genes alvos podem limitar o sucesso na identificação da atuação de HOX em tecidos individuais (Choo e Russell, 2011; Slattery et al., 2011). Desta forma, faz-se necessário o estudo de maneira integrada de dados genômicos, como CHIP-seq, expressão de RNA, Alteração no Número de Cópias (*Copy Number Alteration* (CNA)) e metilação, para entender as complexidades das atividades desses genes em diferentes tecidos tumorais.

A disponibilidade de dados públicos do genoma do câncer em projetos de grande escala que fornecem numerosos ensaios genômicos, principalmente de tumores primários, juntamente com dados clínicos, histopatológicos e de amostras normais permitem a exploração de forma integrada dos dados em um grande número de amostras (Yang et al., 2015). O projeto com maior disponibilidade de dados em um maior número de tumores é o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (Weinstein et al., 2013) que visa a compreensão das bases moleculares do câncer.

Outros projetos são fundamentais para a inserção de informações de elementos regulatórios para busca de alvos de genes HOX. O *Consórcio Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) (An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, 2012), caracterizou de forma global no genoma o mapeamento das regiões transcritas (Djebali et al., 2012), a ligação dos fatores de transcrição ao DNA (Neph, Vierstra, et al., 2012) e a estrutura e modificações dos estados de cromatina (Thurman et al., 2012); O CistromeDB (Mei et al., 2017) é um recurso detalhado abrangente de dados de CHIP-seq e de acessibilidade de cromatina publicamente disponíveis em humanos e camundongos de amostras coletadas do banco de dados

NCBI GEO (Edgar et al., 2002; Barrett et al., 2013), da base de dados ENCODE (An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, 2012) e do projeto *Epigenomics Roadmap* (Bernstein et al., 2010); O Navegador Genômico do Câncer UCSC (Goldman et al., 2015) permite a visualização de dados por localização genômica, com adição de anotações e tipos de dados como faixas adicionais que também auxilia na interpretação de resultados gerados pelos demais projetos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste na caracterização *in silico* do modelo de atuação genes HOX na carcinogênese.

2.2 Objetivos específicos

- Identificação de genes HOX com expressão diferencial em tumores.
- Identificação de alvos de genes HOX em tumores.
- Caracterização de processos biológicos regulados pelos genes HOX em tumores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Todos os dados genômicos das amostras de tecido normal adjacente ao tecido tumoral e de tecido tumoral primário usadas no estudo foram coletadas do banco de dados público TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) na versão *legacy* que possui como genoma referência o hg19, disponíveis até dia 04 de setembro de 2016. Os dados de expressão gênica utilizados no trabalho são advindos do sequenciamento de RNA com a plataforma Illumina HiSeq, nível 3 - Illumina *RNA-Seq V2* do TCGA que possuem as contagens brutas de expressão gênica derivadas do programa RSEM (Li e Dewey, 2011). Já os dados de metilação no estudo, gerados pelo arranjo de metilação de DNA *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array*, são do nível 4 do TCGA, contendo valores de beta para aproximadamente 450.000 sítios CpG (probes) do genoma referência humano hg19. O valor de beta (b) representa a razão entre a intensidade de sinal de probes metiladas (M) e não-metiladas (U) corrigidos pelo normalizador (a):

$$b = M/(M+U+a)$$

em que $b = 1$ representa que todas as células e seus alelos estão metilados e $b = 0$ representa que todas as células e seus alelos não estão metilados. Ambos conjuntos de dados foram baixados pelo pacote R/Bioconductor TCGAblinks (Colaprico et al., 2016). Os dados de CNAs Gistic2 (Mermel et al., 2011) pré analisados utilizados no estudo foram baixados diretamente do cBioPortal (Cerami et al., 2012). A informação foi codificada como uma variável categórica ordenada com 5 diferentes níveis: -2 para deleções em homozigose, -1 para deleções em hemizigose, 0 para sem alterações, 1 para ganhos e 2 para alto nível de amplificação.

Para este trabalho foram selecionados os tumores que possuem dados de expressão gênica, metilação e CNA de amostras normais e tumorais do mesmo paciente, chamadas de amostras pareadas, totalizando 15 tumores. São eles: Carcinoma Urotelial de Bexiga (*Bladder Urothelial Carcinoma* - BLCA), Carcinoma Invasivo de Mama (*Breast Invasive Carcinoma* - BRCA), Carcinoma de Células Cervicais Escamosas e Adenocarcinoma Endocervical (*Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma* - CESC), Colangiocarcinoma (*Cholangiocarcinoma* - CHOL), Adenocarcinoma de Colon (*Colon Adenocarcinoma* - COAD), Carcinoma de Esôfago (*Esophageal Carcinoma* - ESCA), Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* - HNSC), Carcinoma Renal de Células Claras (*Kidney Renal Clear Cell Carcinoma* - KIRC), Carcinoma Hepatocelular (*Liver Hepatocellular Carcinoma* - LIHC), Adenocarcinoma de Pulmão (*Lung Adenocarcinoma* - LUAD), Carcinoma de Células Escamosas do Pulmão (*Lung Squamous Cell Carcinoma* - LUSC), Adenocarcinoma de Pâncreas (*Pancreatic Adenocarcinoma* - PAAD), Adenocarcinoma de Próstata (*Prostate Adenocarcinoma* - PRAD), Carcinoma de Tireóide (*Thyroid Carcinoma* - THCA), Carcinoma de Endométrio (*Uterine Corpus Endometrial Carcinoma* - UCEC). Os sítios primários dos tumores e o número de amostras normais e tumorais por tipo de dado (expressão gênica, metilação e CNA) estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Número de amostras utilizadas nos diferentes estudos desse trabalho por cada tipo tumoral

Tumor	Sítio primário	Normal e Tumor <i>Expressão gênica</i> ¹	Normal e Tumor <i>Metilação</i> ²	Normal e Tumor <i>Expressão gênica e Metilação</i> ³	Normal e Tumor <i>Expressão gênica, Metilação e CNA</i> ⁴
BLCA	Bexiga	34	42	34	34
BRCA	Mama	226	182	156	152
CESC	Cérvix	6	6	6	6
CHOL	Ducto Biliar	18	18	18	18
COAD	Colorretal	52	76	32	32
ESCA	Esôfago	22	32	18	18
HNSC	Cabeça e Pescoço	86	100	40	40
KIRC	Rim	144	320	48	48
LIHC	Fígado	100	100	82	82
LUAD	Pulmão	116	58	36	36
LUSC	Pulmão	102	80	14	14
PAAD	Pâncreas	20	20	8	8
PRAD	Prostata	104	100	70	70
THCA	Tireóide	59	112	100	49
UCEC	Útero	66	66	14	14

¹Número de amostras normais e tumorais do mesmo paciente que possuem dados de expressão gênica. Exemplo: amostras normais e tumorais de 72 pacientes com KIRC com dados de expressão gênica disponíveis; ²Número de amostras normais e tumorais do mesmo paciente que possuem dados de metilação. Exemplo: Existem amostras normais e tumorais de 160 pacientes com KIRC com dados de metilação disponíveis; ³Número de amostras normais e tumorais do mesmo paciente que possuem dados de expressão gênica e metilação. Exemplo: Existem amostras normais e tumorais de 24 pacientes com KIRC com dados de expressão gênica e metilação disponíveis; ⁴Número de amostras normais e tumorais do mesmo paciente que possuem dados de expressão gênica, metilação e CNA. Exemplo: Existem amostras normais e tumorais de 24 pacientes com KIRC com dados de expressão gênica, metilação e CNA disponíveis.

3.2. Métodos

O trabalho foi desenvolvido *in silico* no laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto. Um servidor com processador Intel Xeon CPU E7- 2870 @ 2.40GHz (32 cores), de 128GB de memória RAM e capacidade de armazenamento de 19TB foi utilizado para as análises. As linguagens de programação bash e R foram utilizadas através da criação de funções.

Para caracterização do modelo de atuação dos genes HOX na carcinogênese primeiramente foram identificados os genes diferencialmente expressos. O perfil de alteração da expressão dos genes HOX em tumores foi associado ao eixo A-P do

corpo humano, posição dos genes HOX dentro do seu *cluster* gênico, bem como aos folhetos embrionários originários dos tecidos tumorais (Figura 2). Alvos de genes HOX foram identificados e quando diferencialmente expressos foram correlacionados com a expressão dos genes HOX também diferencialmente expressos entre os tumores, independentemente dos índices de metilação e CNA. Por fim, as associações finais entre os genes HOX e seus alvos foram enriquecidas em vias e processos biológicos dos bancos de dados KEGG e GO, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Representação do *workflow* da análise desenvolvida neste trabalho.

3.2.1 Abordagem *in silico* para identificação de genes diferencialmente expressos

Para cada tumor primário o presente trabalho objetivou identificar o perfil de alteração da expressão de genes em tumores, especialmente dos genes HOX, em comparação ao seus tecidos normais. Desta forma, foram realizadas as análises de expressão diferencial entre amostras normais adjacentes ao tumor e tumorais com o pacote R/Bioconductor EdgeR (Robinson et al., 2010) pelo método modelos lineares generalizados, uma vez que foram utilizadas amostras pareadas e neste caso não

existe o interesse no efeito do nível de expressão de um paciente de forma individual. Genes com o p-valor ajustado ao *False Discovery Rate* (FDR) menor que 0,01 foram determinados como genes diferencialmente expressos. Com a função “cpm” do pacote EdgeR os dados normalizados em Contagens Por Milhão (CPM) foram extraídos para a construção dos *heatmaps* e análises estatísticas. Os gráficos volcano plot foram gerados com a função “TCGAVisualize_volcano” do pacote TCGAbiolinks e os heatmaps utilizando o pacote R/Bioconductor ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) com distância Correlação de Pearson e Clusterização Hierárquica ward.D2.

A identificação do número de agrupamentos significativos entre os tumores a partir dos valores de *fold-change* de cada HOX foi realizada com o pacote R Pvclust (Suzuki e Shimodaira, 2006) com 10000 *bootstraps* e intervalo de confiança em 95%. O pvclust fornece dois tipos de p-valores: Aproximadamente Imparcial (AU) e Probabilidade de Bootstrap (BP). O p-valor AU, calculado por uma reamostragem multivariada, é uma melhor aproximação do p-valor do que BP que é calculado pela remoção de sequência padrão.

3.2.2 Análise de associação dos genes HOX

A hipótese nula de que os genes HOX com super expressão em tumores comparados aos seus tecidos normais pareados não estão associados com o eixo A-P do corpo humano, posição dos genes HOX dentro do *cluster* gênico ou com o folheto embrionário do sítio primário dos tumores foi testada no R pelo Teste Exato de Fisher e Qui-quadrado, respectivamente. Sítios primários tumorais estão localizados acima do umbigo foram consideradas como porção anterior do corpo humano e regiões abaixo do umbigo foram caracterizadas como região posterior, conforme caracterizado por (Rinn et al., 2006).

3.2.5 Abordagem *in silico* para identificar alvos dos genes HOX

Para identificação de alvos de genes HOX foram obtidas prováveis regiões em que as proteínas dos genes HOX se ligam ao DNA em humanos identificadas pela técnica de CHIP-seq, denominadas como picos de ligação. Essas regiões foram mapeadas com a ferramenta BWA (Li e Durbin, 2009) e identificados com a ferramenta MACS2 (Zhang et al., 2008), disponíveis na plataforma CistromeDB (Mei

et al., 2017) no dia 4 de Março 2017. Utilizou-se experimentos de CHIP-seq das linhagens celulares tumorais humanas LoVo (Yan et al., 2013), BT-474 (Heinonen et al., 2015), OCI-Ly2 (Walsh et al., 2014), LHSAR, LNCaP (Pomerantz et al., 2015) e SEM (Huang et al., 2012) que correspondem aos tumores de Cólon, de Mama, Linfoma, de Próstata e Leucemia Linfobástica Aguda, respectivamente, totalizando 34 diferentes experimentos com 28 genes HOX. Todas os picos correspondem à coordenadas genômicas do genoma referência humano GRCh38.p7.

Os picos de ligação das proteínas HOX ao DNA foram filtrados quanto aos critérios de qualidade de $q\text{-valor} < 0,00005$ (Robertson et al., 2007) e *Fold change* do pico em relação ao *background* > 4 . Para identificar alvos dos HOX, as coordenadas dos picos de ligação foram anotadas com a ferramenta Bedtools closest v2.26.0 (Quinlan e Hall, 2010) a partir do arquivo *General Feature Format* (GTF) do Ensembl versão 85 (Yates et al., 2016), utilizando os parâmetros -D ref -t all -iu, -a com os arquivos *Browser Extensible Data* (BED) contendo os picos dos genes HOX e -b sendo o arquivo GTF referência. Essas interações quando presentes na região promotora, definidas neste trabalho como sendo 2000 pb *upstream* ao início de transcrição de um determinado gene, foram consideradas reguladoras da transcrição do gene ao qual ela se aproxima, logo o gene foi considerado um alvo dos HOX.

Nos casos que não existiram a interseção entre o pico de interação dos HOX ao DNA com as regiões promotoras, foram utilizadas informações das regiões regulatórias capazes de alterar a conformação genômica para a seleção de alvos, identificados na linhagem celular de Carcinoma de Pulmão A549 pela técnica Hi-C (Belton et al., 2012) baixadas do ENCODE (An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, 2012). Dada a sobreposição do pico com as coordenadas da região regulatória em uma distância de até 200 pb *upstream* ou *downstream*, identificada pela ferramenta Bedtools *window* v.2.26.0 (Quinlan e Hall, 2010) com o parâmetro -w 200, a anotação dessa coordenada foi estipulada a partir da presença da região de alteração conformacional no promotor gênico (2000 pb), a qual a região regulatória se liga.

Considerando que os alvos dos genes HOX podem variar entre tecidos (Svingen e Tonissen, 2006) e a escassez de dados de CHIP-seq para humanos de genes HOX na literatura, foi utilizada uma abordagem para inferir alvos de genes HOX

(Cohn et al., 2015; Boeva, 2016; Lo et al., 2017) diferentes dos identificados pelo método de CHIP-seq, em colaboração com o Prof. Dr. Israel Tojal da Silva do Centro Internacional de Pesquisa do Hospital A.C. Camargo. Para tanto, as sequências de nucleotídeos correspondentes aos picos de ligação dos genes HOX foram transformadas em arquivos de formato fasta utilizando a ferramenta Bedtools getfasta v2.26.0 (Quinlan e Hall, 2010). Esses arquivos foram então empregados para identificação *de novo* de motivos de DNA que indicam a especificidade sequencial de sítios de ligação dos genes HOX no DNA (D'haeseleer, 2006) através do programa MEME v4.11.4 (Bailey e Elkan, 1994). Para averiguar a similaridade entre os motivos de DNA identificados dos mesmos genes HOX advindos de experimentos diferentes de CHIP-seq foi utilizada a plataforma *online Regulatory Sequence Analysis Tools* (RSAT) (Medina-Rivera et al., 2015), a qual agrupou os motivos a partir da distância de correlação de pearson e o método de agrupamento hierárquica *average* com os parâmetros $Ncor = -1$, $cor = 1$ e $w = 0$. Para identificação do número de agrupamentos significativos e elaboração do dendograma foram utilizados os pacotes R Pvcust com 10000 *bootstraps* e intervalo de confiança em 95% com e o pacote R dendextend (Galili, 2015).

O mapeamento dos motivos no genoma referência humano GRCh38.p7 foi realizado pela ferramenta FIMO (Grant et al., 2011). As regiões escaneadas no genoma foram filtradas segundo os critérios de qualidade e-valor $\leq 0,00001$ e q-valor $\leq 0,001$. A anotação das regiões em que os motivos foram mapeados no genoma foi executada da mesma forma como a anotação dos picos de CHIP-seq. Motivos mapeados nas regiões promotoras e em regiões regulatórias capazes de alterar a conformação genômica que também estão na região promotora foram associados ao gene mais próximo e esse gene considerado como possível alvo dos genes HOX.

Os possíveis alvos identificados pelas metodologias de CHIP-seq e identificação de motivos foram comparados com possíveis alvos descritos na literatura pelo pacote R VennDiagram (Chen e Boutros, 2011) com o objetivo de filtrar todos possíveis alvos identificados. Os alvos dos genes HOX em humanos conhecidos da literatura foram extraídos do pacote tftargets disponível em: <https://github.com/slowkow/tftargets>, o qual reúne informações dos bancos de dados TRED (Jiang et al., 2007), ITFP (Zheng et al., 2008), Neph2012 (Neph, Stergachis, et al., 2012),

TRRUST (Han et al., 2015) e Marbach (Marbach et al., 2016). Desta forma todos os alvos identificados pela análise de CHIP-seq por pelo menos 2 métodos foram considerados como alvos finais dos genes HOX.

3.2.6 Análise estatística usada para associação entre os genes HOX e seus alvos nos tumores

Na tentativa de melhor caracterizar a ação dos genes HOX na tumorigênese foi identificada a correlação de expressão entre os genes HOX e seus alvos preditos neste estudo nos diferentes tumores. Alterações no número de cópias do DNA genômico e na metilação do DNA do promotor frequentemente alteram a expressão do mRNA de um dado gene (Jacobsen et al., 2013) e podem introduzir ruído na avaliação de uma possível interação reguladora transcricional entre um dado par de HOX μ e alvo j . Para explicar esses efeitos, utilizou-se um modelo de regressão linear multivariada em que a expressão do gene alvo j (y) em logaritmo da base 2 (log2) muda como uma função linear do número de cópias de DNA (variável categórica CN), metilação do DNA (variável numérica MET, com valor beta entre 0 e 1) e expressão de HOX μ também em logaritmo da base 2 através de amostras normais e tumorais de um dado tipo de câncer:

$$y_i = \beta_0 + \beta_{CN,j} X + \beta_{MET,j} X + \beta_{\mu,j} X.$$

Todas as sondas de metilação do DNA mapeadas em um locus de gene particular foram inclusas nos modelos de regressão como fatores independentes. A correlação μ e j foi calculada como a raiz quadrada da fração de variância da expressão gênica explicada pela expressão de μ por ANOVA, obtida com a soma dos quadrados do Tipo III, após contabilização dos outros fatores, como sua interação com a expressão do alvo j (quando aplicável), CNAs e MET. A direção da correlação, positiva ou negativa designada pelo valor de R , bem como a estatística t e o valor de p resultantes foram calculados a partir dos coeficientes dos modelos lineares.

A regressão não pôde ser calculada em alguns casos em que o alvo ou o HOX não foram detectados como diferencialmente expressos nos dados de RNA-seq de um tipo de tumor particular. Nesses casos, a correlação entre μ e j naquele tipo de

tumor foi considerado como inexistente. Portanto, apenas realizou-se o cálculo de associação dos genes HOX com seus alvos com 9 tumores (BLCA, BRCA, COAD, HNSC, KIRC, LIHC, LUAD, PRAD e THCA)

As associações entre os genes HOX e seus alvos em cada tumor foram dispostos em gráficos de heatmap gerados com o pacote R/Bioconductor ComplexHeatmap, função Heatmap.

3.2.7 Frequência de recorrência de alvos dos genes HOX nos tumores

Para avaliar se existe recorrência de associação dos alvos de cada HOX nos tumores foi avaliado se o alvo apresenta-se correlacionado com o gene HOX em apenas um tumor ou em dois ou mais tumores. Quando a frequência de correlação dos alvos de um dado gene HOX em dois ou mais tumores é menor que 40% considerou-se que o gene HOX não possui alvos recorrentes entre os tumores.

3.2.8 Enriquecimento de vias e ontologias biológicas

O enriquecimento dos alvos dos genes HOX em vias biológicas do banco de dados KEGG (Kanehisa e Goto, 2000; Kanehisa et al., 2016) e em ontologias gênicas relacionadas à processos biológicos (Ashburner et al., 2000; Gene Ontology Consortium: going forward, 2015) foi realizada com o pacote R/Bioconductor clusterProfiler (Yu et al., 2012). Cada gene HOX foi enriquecido com todos os alvos que possuem alguma associação significativa em pelo menos 1 dos tumores analisados e que a soma total de alvos seja maior que 15. Critérios de p-valor menor ou igual 0,05 e q-valor menor ou igual a 0,05 foram utilizados para considerar as vias e processos biológicos enriquecidos. Os gráficos de representação das vias biológicas do KEGG foram elaborados com o pacote R/Bioconductor Pathview (Luo e Brouwer, 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do perfil de alteração da expressão dos genes HOX em tumores

A análise supervisionada da expressão dos fatores de transcrição HOX realizada entre amostras de tecido normal adjacente ao tumor e tumoral caracterizou diversos perfis de alteração da expressão dos genes HOX em relação ao posicionamento

desses genes no genoma e aos subtipos tumorais. Entre os 15 tumores analisados verificou-se 3 padrões globais de expressão de fatores de transcrição HOX entre os tumores (Figura 3). O primeiro padrão é constituído pelos genes HOXB13, HOXC6, HOXC11, HOXC12, HOXC13 que possuem apenas a super expressão nos tumores em comparação aos seus tecidos normais adjacentes. Como apresentado na Tabela 1, apenas o fator de transcrição HOXC13 havia sido reportado como unicamente alto expresso em tumores. Em contrapartida, o padrão 2, contendo os genes HOXA2 e HOXB4, possui apenas a expressão reduzida no tumor em comparação aos seus tecidos normais adjacentes (Figura 3). Curiosamente, o gene HOXB4 havia sido relatado apenas como unicamente alto expresso em tumores, dados antagônicos aos descritos neste trabalho (Tabela 1).

Figura 3. Heatmap dos valores de fold-change em log2 que possuem valores de $p \geq 0.01$ da

expressão dos genes HOX a partir da análise comparativa entre amostras normais e tumorais. Os genes e os tumores estão hierarquicamente agrupados pelo método de ward.D2 a partir da Correlação de Pearson. As porcentagens de tumores com super expressão e baixa expressão para cada HOX estão representadas em vermelho e verde, respectivamente, ao lado dos genes HOX. As porcentagens de HOX super expressos e menos expressos para cada tumor estão representadas em vermelho e verde, respectivamente, ao lado dos tumores.

Os demais fator de transcrição HOX, todos membros do padrão 3, apresentaram expressão reduzida ou aumentada dependendo do câncer. O HOXB1, HOXB6, HOXB7, HOXB9, HOXC4 e HOXC9, por exemplo, apesar de apresentarem expressão reduzida no Carcinoma Renal de Células Claras (KIRC), estão super expressos nos demais tumores em que possuem expressão alterada em comparação ao tecido normal. Os HOXC10, HOXD13, HOXD12, HOXC8 e HOXA1 também apenas detém expressão reduzida em um dos tumores analisados em comparação ao tecido normal. Já HOXA4 e HOXA5 estão *down-regulados* em praticamente todos os tumores que apresentam alteração no nível de expressão, estando altamente expressos apenas em KIRC e HNSC, respetivamente (Figura 3).

Quanto à posição dos HOX no genoma, o estudo revelou duas diferentes assinaturas de expressão entre os tumores ($p = 0,001$) (Figura 3; Figura 4A). A assinatura 1 está enriquecida com fator de transcrição HOX da porção 5' do genoma (HOX8-13) preferencialmente super expressos, enquanto o grupo 2 está enriquecido com genes HOX da porção 3' do genoma (HOX1-7) que estão preferencialmente com expressão reduzida nos tumores. Apesar do enriquecimento, existe ainda uma subdivisão dentro da assinatura 1 com os genes HOXB1-6. Estes genes apresentam um perfil mais complexo de expressão, em geral são mais expressos em LUAD, LUSC, HNSC e ESCA e menos expressos em KIRC e COAD, semelhante ao observado no desenvolvimento embrionário.

Entre os tumores, dois perfis de expressão de HOX foram identificados. No primeiro perfil, composto pelos tumores CHOL, ESCA, HNSC e PAAD, os HOX estão apenas super-expressos enquanto no CESC, integrante do segundo perfil, esses fatores de transcrição estão apenas *down-regulados*. Ademais, observou-se que a alteração do nível de expressão dos HOX nos tumores está associada ao eixo corporal humano, como é possível observar nas Figuras 3 e 4B. Os grupos 1 e 2 estão enriquecidos por tumores que encontram-se na porção anterior e posterior do corpo humano ($p\text{-valor} = 0,002$) (Figura 3), respectivamente. A semelhança no nível de expressão dos genes HOX dado o eixo A-P em adultos já havia sido

relatada em fibroblastos (Rinn et al., 2006), mas este é o primeiro relato da presença de uma assinatura em cânceres. Os tumores localizados no eixo anterior (acima do umbigo) estão enriquecidos com a super-expressão dos HOX (RP=7,891345; p-valor=0,000000000000236502).

Figura 4. Dendograma com valores de *fold-change* da expressão dos genes HOX a partir da análise comparativa entre amostras normais adjacentes ao tumor e tumorais. A) Agrupamento por gene HOX. B) Agrupamento por tumor. As caixas vermelhas representam os dois agrupamentos significativos identificados. AU representa valores aproximadamente imparciais dos p-valores e BP representa a probabilidade de determinado agrupamento após o *Bootstrap* padrão.

Dos 15 tumores analisados, 11 possuem origem no folheto embrionário endoderme, 3 na mesoderme e 1 na ectoderme. Os tumores advindos da endoderme estão enriquecidos com a super-expressão dos HOX (p-valor=0,0000000000000001586024). Uma análise *in silico* demonstrou um enriquecimento significativo dos sítios de ligação de HOX/PBX na região promotora dos genes expressos na endoderme em comparação com a ectoderme nos embriões de *Nematostella vectensis* (Hudry et al., 2014). Desta forma observa-se que novamente os padrões de desenvolvimento são replicados em cânceres.

4.3 Caracterização de alvos dos genes HOX

Muitos alvos dos genes HOX têm sido descritos em trabalhos utilizando os dados genômicos, como CHIP-seq, em outros animais (Agrawal et al., 2011). Contudo, em humanos, a maioria dos estudos que relatam alvos de HOX não utilizam experimentos de larga escala ou demonstram a especificidade dos alvos de HOX em tumores (Svingen e Tonissen, 2006; Jolma et al., 2013; Morgan et al., 2016). Dessa forma, com o objetivo de observar a funcionalidade dos genes HOX no

câncer identificou-se alvos a partir de dados de CHIP-seq e por predição de motivos que combinados com alvos conhecidos ajudam na compreensão global e específica da atividade dos fatores de transcrição HOX no câncer.

4.3.1 Alvos identificados pelo experimento de CHIP-seq

A partir do download dos dados de CHIP-seq no banco de dados CistromeDB (Mei et al., 2017) (ver métodos), foram obtidos 407113 picos entre todos os estudos de todos os genes HOX (Figura 5A), com média de tamanho de 235 pb (Figura 5B).

Figura 5. Características dos picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB. A) Número de picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX. B) Tamanho dos picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX.

A acessibilidade da cromatina, determinada tradicionalmente por regiões de conformação "aberta" ou "fechada", é regida por elementos cis-reguladores acessíveis da sequência do DNA, pela remodelação de cromatina dependente de ATP e modificações de nucleossomos (Bell et al., 2011). A acessibilidade da cromatina pode ser examinada por digestão com clivagem em sítios que a DNase I se liga ao DNA (Wu et al., 1979) e, combinada à tecnologia de sequenciamento de nova geração (DNase-seq), tem sido utilizada para revelar elementos regulatórios, incluindo potenciadores (*enhancers*), silenciadores, promotores, isoladores e regiões de controle de locus *in vivo* em um tecido específico ou tipo celular em uma escala genoma (Song e Crawford, 2010). Então, para posteriores análises apenas picos que passaram os filtros de qualidade citados na metodologia e que possuem no máximo 200 pb de distância *upstream* ou *downstream* aos sítios de

hipersensibilidade à DNase de todas as linhagens disponíveis no banco de dados público *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) (An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, 2012) foram considerados. Desta forma aumentou-se a possibilidade de que a região do pico seja potencialmente regulatória. Após a aplicação dos filtros de qualidade e de interseção com sítios de Hipersensibilidade à DNase do ENCODE, um total de 268857 picos entre todos os estudos de todos os genes HOX foram utilizados para identificação de alvos de HOX (Figura 6A-B).

Figura 6. Características dos picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB após o filtro de qualidade e de interseção com sítios de hipersensibilidade a DNase do ENCODE. A) Número de picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX. B) Tamanho dos picos identificados nos dados de CHIP-seq para cada experimento realizado com os genes HOX.

A presença dos picos de ligação de HOX ao DNA, antes e após os filtros de qualidade, em relação às regiões gênicas está ilustrada na Figura 7. Houve uma grande redução no número de picos contudo, mesmo com a aplicação dos filtros, a porcentagem relativa de picos em regiões promotoras se manteve entre todos os genes HOX. Entretanto, a porcentagem relativa de picos em regiões 3' UTR teve uma grande queda e picos em regiões distais inter gênicas tiveram um grande aumento, evidenciando que os genes HOX em células adultas também se ligam em regiões regulatórias, como *enhancers*, insuladores ou silenciadores, e não apenas em promotores gênicos. A presença de picos de ligação de genes HOX em regiões distais, por exemplo, já foi ilustrada em trabalhos com *Drosophila* (Sorge, Ha, Polychronidou, Friedrich, Bezdan e Kaspar, 2012; Penkov et al., 2013),

camundongos (Donaldson et al., 2012) e humanos (Heinonen et al., 2015), todavia este é o primeiro perfil da ligação distal envolvendo um grande conjunto de fatores de transcrição HOX em humanos.

Figura 7. Porcentagem dos picos em posições genômicas. A) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB. B) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB após o filtro de qualidade e de interseção com sítios de hipersensibilidade a DNase do ENCODE.

Além disso, observou-se que há fatores de transcrição HOX que ligam-se preferencialmente à regiões promotoras ou à regiões distais (Figura 7). Os HOX que possuem pelo menos 25% dos picos localizados na região promotora foram considerados como atuantes no promotor (HOXA1, HOXA2, HOXA4, HOXA5,

HOXA6, HOXA10, HOXA13, HOXB4, HOXB6, HOXB13, HOXC6, HOXC8 e HOXC13), enquanto o HOXA7, HOXA9, HOXA11, HOXB1, HOXB2, HOXB5, HOXB7, HOXB8, HOXC9, HOXC11, HOXD1, HOXD4, HOXD9 e HOXD11 foram considerados como atuantes em porções distais aos genes, pois possuem mais de 25% dos picos concentrados nessas regiões. Esse perfil de ligação dos picos também é observado quando analisa-se a frequência de picos próximos ao Sítio de Início de Transcrição dos genes (*Transcript Start Site* - TSS). É possível notar que os HOX que possuem maior frequência relativa de picos contínuos posicionados preferencialmente próximos do TSS (Figura 8) são os mesmos HOX que ligam-se preferencialmente na região promotora e os HOX que possuem frequência de picos descontínua que flanqueiam preferencialmente a região 5' do TSS (Figura 8) ligam-se preferencialmente à regiões distais gênicas.

Figura 8. Distribuição da frequência de picos próximos ao TSS. A) Picos de CHIP-seq depositados no

banco de dados CistromeDB. B) Picos de CHIP-seq depositados no banco de dados CistromeDB após o filtro de qualidade e de interseção com sítios de hipersensibilidade a DNase do ENCODE.

O perfil de ligação de vários fatores de transcrição HOX em *enhancers* de humanos, especialmente no câncer, têm implicações na complexidade de regulação dos alvos dos genes HOX visto que a mesma ligação de HOX no *enhancer* pode regular diferentes alvos de formas diferentes (Li et al., 2016). Interessantemente, grande parte dos genes HOX que apresentaram preferência de ligação ao DNA distal aos alvos são os que possuem menor expressão nas linhagens celulares estudadas, como observado na Figura 9. Contudo genes como HOXC8 e HOXC9 que possuem preferência de ligação ao DNA próxima em regiões promotoras também detém expressão *downregulada*. Apesar da alteração da expressão dos fatores de transcrição HOX poder ser regulada pelo número de cópias, a expressão dos genes HOXA6 e HOXA7, por exemplo, está *up* regulada sem nenhuma CNA (Figura 9).

Figura 9. Oncoprint com a expressão e CNA dos genes HOX em cinco linhagens celulares do CCLE em que foram realizados experimentos de CHIP-seq.

Devido ao grande número de picos se ligarem a regiões distais gênicas foi utilizado um experimento de Hi-C para identificação dos alvos cis-regulados (ver métodos). No total, 31.691 possíveis alvos de todos genes HOX foram identificados com os picos de CHIP-seq, sendo 26120 alvos considerando que os genes HOX estão ligados nas suas regiões promotoras e 22578 considerando que os genes HOX estão ligados à regiões distais gênicas, como *enhancers* e desta forma

estariam indiretamente regulando a região promotora dos alvos que os *enhancers* se ligam.

Na figura 10 observa-se os alvos identificados pelos dados de CHIP-seq. Os alvos estão distribuídos em todos os cromossomos (Figura 10), no entanto os HOXD9-13 possuem maior número. Em *Drosophila*, experimentos de CHIP-seq com os genes homeobox Ubx, Abd-A e Abd-B revelaram que existe uma alta similaridade entre os sítios de ligação das proteínas Ubx e Abd-A enquanto a proteína Abd-B, apesar de também se ligar à sítios similares, possui um número maior de sítios adicionais (Beh et al., 2016). Desta forma verifica-se que esta característica é conservada entre as espécies.

Figura 10. Ideograma com a localização cromossômica dos alvos de genes HOX identificados pela metodologia de CHIP-seq. Cada ponto representa um alvo identificado por essa metodologia.

A maioria dos HOX possuem alvos compartilhados (Figura 10), principalmente entre os genes HOXA7, HOXA9, HOXA11, HOXB1, HOXB2, HOXB5, HOXB7, HOXB8, HOXC11, HOXC13, HOXD1, HOXD4, HOXD11 e HOXD13 que possuem o menor número de alvos. Como esperado, os alvos encontrados para os mesmos HOX em diferentes estudos são muito semelhantes, indicando a conservação dos alvos também em diferentes tipos celulares. Além disso, o perfil de ligação à

promotores ou em regiões distais de HOX se manteve.

Curiosamente, 23 genes HOX apresentaram picos de ligação com, em média, 1593 pb de distância da região promotora do gene MTRNR2L1 nas linhagens LoVo, OCI-Ly2, SEM e BT-474 e (Figura 11). Esta região, além da presença de sítios de hipersensibilidade à DNase, possui conservação relevante entre invertebrados, além de marcações de acetilação no 27º resíduo de lisina da proteína histona H3 (H3K27ac) (Figura 11). O H3K27ac está associado à maior ativação da transcrição e, portanto, é definido como uma marca ativadora (Creyghton et al., 2010), sugerindo que esses genes HOX ativam a expressão desse gene. O gene MTRNR2L1, também conhecido como humanina (HN), tem efeitos citoprotetores, metabólicos e anti-inflamatórios em múltiplos tipos de células e modelos animais, incluindo os efeitos benéficos da HN sobre morte celular induzida por H₂O₂ (Klein et al., 2013), toxicidade amilóide A β (Hashimoto et al., 2001), morte induzida por inanição sérica de células neuronais (Kariya et al., 2002) e morte induzida por LDL oxidado em células endoteliais vasculares (Bachar et al., 2010). A humanina é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo células neuronais (Park et al., 2013), músculos esqueléticos (Kin et al., 2006), células derivadas de sangue (Wang et al., 2005) e também são detectadas no plasma (Chin et al., 2013). Este gene não está na lista de genes utilizados para quantificação de expressão gênica nos dados do TCGA versão *legacy* e desta forma não foi possível o cálculo de sua correlação com os genes HOX que o regulam nos tumores.

Figura 11. Picos de ligação de 23 genes HOX na região promotora do gene MTRNR2L1 do genoma referência GRCh38. A região completa dos picos está marcada em laranja.

4.3.2 Alvos identificados pela busca de motivos

A partir das sequências que os genes HOX se ligam ao DNA identificadas pelos experimentos de CHIP-seq, foram identificados os motivos de ligação ao DNA e os logos podem ser vistos na Figura 12. Diferentemente do esperado, nenhum motivo TAAT foi observado, indicando possível atuação dos genes HOX em dímeros com cofatores ou participando de outros complexos desconhecidos que poderiam aumentar sua especificidade (Mann et al., 2009).

Figura 12. Motivos de ligação de HOX ao DNA identificados a partir de sequências do CHIP-seq. As linhagens dos genes HOX que possuem experimentos diferentes dos realizados em LoVo estão indicados nas legendas.

Suportando essa hipótese foi demonstrado que a proteína Ubx em complexo com seu cofator Exd está vinculado especificamente com *clusters* de sítios de baixa afinidade em *enhancers* do gene Shavenbaby de *Drosophila* (Crocker et al., 2015). Estes sítios de baixa afinidade conferiram especificidade para ligação Ubx *in vivo*,

mas vários sítios em *cluster* foram necessários para expressão robusta no desenvolvimento dos embriões. Embora na maioria dos indivíduos os sítios de ligação Ubx não sejam conservados de forma evolutiva, a arquitetura geral dos *enhancers*, clusters de sítios de ligação de baixa afinidade, é mantida e necessária para a função de *enhancer* (Crocker et al., 2015).

Na figura 13 é possível observar dois agrupamentos significativos identificados entre os motivos. Genes HOX que possuem mais de um experimento encontram-se no mesmo grupamento. O grupo identificado pela cor roxa apresenta um domínio em comum, a sequência nucleotídica "TGGA".

Figura 13. Dendrograma dos motivos identificados através dos dados de CHIP-seq de HOX. Diferentes linhagens estão representadas nas legendas.

Pela análise de busca de motivos, 2031 alvos de genes HOX foram identificados no total. Todos os alvos que originaram os motivos estão presentes nos alvos identificados pela busca de motivos no genoma, validando a abordagem. Os genes HOXA5, HOXB13, HOXC9, HOXC13, HOXD9 e HOXD13 apesar de possuírem motivos identificados, não tiveram alvos escaneados com valores significativos no genoma humano GRCh38.

Apesar de existirem muitos alvos similares entre os genes HOX, os genes da porção 3' HOX1-4 e os genes da porção intermediária do *cluster* HOX6-8 possuem maior número de preditos alvos identificados por esta abordagem (Figura 14) que estão dispersos por todo genoma. A maioria dos HOX possuem alvos compartilhados (Figura 14) como também identificado nos possíveis alvos preditos

pela metodologia de CHIP-seq.

Figura 14. Ideograma com a localização cromossômica dos alvos de genes HOX identificados pela busca de motivos. Cada ponto representa um alvo identificado por essa metodologia.

4.3.3 Análise comparativa dos alvos identificados

Os alvos identificados pelas metodologias de CHIP-seq e escaneamento de motivos foram comparados com alvos já descritos na literatura depositados em bancos de dados (ver métodos). Entre todas as metodologias foram encontrados 608 alvos em comum à todos os métodos, 36 alvos entre a busca de motivos e a literatura, 1125 alvos entre a metodologia de CHIP-seq e o escaneamento de motivos, 3964 entre motivos já descritos na literatura e identificados pelos dados de CHIP-seq para todos os genes HOX, totalizando 5733 possíveis alvos (Figura 15).

Figura 15. Diagrama de Venn com número de alvos identificados pelas metodologias de CHIP-seq, escaneamento de motivos e alvos já descritos na literatura.

Para as futuras análises foram considerados apenas os alvos identificados por pelo menos duas metodologias entre as 3 abordadas, uma vez que há relativamente grande sobreposição entre as listas de genes gerados entre os estudos de HOX. Desta forma, foram caracterizados alvos finais para 28 genes HOX. Os alvos finais considerados no trabalho entre todos os genes HOX são em sua maioria codificadores de proteínas, com 3288 alvos identificados. Muitos RNAs longos não codificadores também são alvos de genes HOX ($n=1677$), bem como 558 Pseudogenes e 210 RNAs pequenos não codificadores (Figura 16). Todavia, serão utilizados apenas genes codificadores de proteínas para as análises de associações nos tumores, devido à disponibilidade de dados no TCGA.

Figura 16. Número de alvos de todos os genes HOX de acordo com o tipo gênico.

Com o método utilizado neste trabalho foi possível ampliar os alvos conhecidos da literatura para o HOXB1, por exemplo, bem como filtrar alvos importantes para os

genes HOXA6, gene com maior número de alvos finais identificados (n=1008), seguido pelos genes HOXB13 (n=962), HOXA1 (n=637), HOXA4 (n=266) e HOXC9 (n=229) como é possível observar na Tabela 3. Esses genes também são os que possuem um maior número de alvos específicos. Os demais HOX compartilham até 100% dos seus alvos (Figura 15). Todos os alvos finais identificados no trabalho estão disponíveis no Anexo I.

Tabela 3. Número de alvos de HOX identificados na Literatura, pelas metodologias de CHIP-seq, escaneamento de motivos e de alvos que foram identificados em pelo menos duas metodologias das três metodologias.

Genes HOX	Literatura	CHIP-Seq	Motivos	Pelo menos dois métodos
HOXA1	3980	3029	135	637
HOXA2	845	1256	702	160
HOXA3	945	0	0	0
HOXA4	597	10155	25	266
HOXA5	1400	241	0	27
HOXA6	724	8600	1131	1008
HOXA7	940	65	140	51
HOXA9	2332	140	130	61
HOXA10	2027	107	157	65
HOXA11	1188	57	132	52
HOXA13	1964	203	114	66
HOXB1	2	53	120	108
HOXB2	501	59	154	51
HOXB3	1027	0	0	0
HOXB4	588	99	133	53
HOXB5	1241	55	140	52
HOXB6	492	248	0	72
HOXB7	618	84	147	50
HOXB8	751	48	150	44
HOXB9	1141	0	0	0
HOXB13	1860	15776	0	962
HOXC4	697	0	0	0
HOXC5	617	0	0	0
HOXC6	705	137	167	54
HOXC8	782	257	119	63
HOXC9	642	8539	0	229
HOXC10	2549	0	0	0
HOXC11	2025	51	137	54
HOXC12	1193	0	0	0
HOXC13	1697	66	0	3
HOXD1	3752	53	116	70
HOXD3	1071	0	0	0
HOXD4	0	56	184	51
HOXD8	1432	0	0	0
HOXD9	2144	59	0	3
HOXD10	1257	0	0	0
HOXD11	1418	67	173	53
HOXD12	1259	0	0	0
HOXD13	2139	58	0	4

4.4 Caracterização de alvos de HOX na modulação de cânceres

Para cada gene HOX foi observado o potencial de associação com os alvos finais em cada tumor. O número de associações significativas para cada HOX não foi associada ao perfil de alteração da expressão gênica, ou seja, os genes unicamente super expressos ou *down-regulados* em tumores não possuem maior número de associações com alvos. Da mesma forma, não houve correlação entre os dois perfis de frequência de picos de ligação ao DNA dos genes HOX com o número de alvos identificados.

O perfil do potencial de associação da expressão dos alvos pelos genes HOX se dá de forma específica entre os tumores (Figura 17), ou seja, a frequência de recorrência de associação dos alvos entre os tumores é baixa (entre 0% a 40% dos alvos) e não está presente a todos ou a maioria dos tumores analisados entre a maioria dos genes HOX. Apenas o gene HOXA5 detém grande recorrência nas associações dos alvos entre os 5 tumores em que ele é diferencialmente expresso (frequência = 66,66%), enquanto os genes HOXB5, HOXB8 e HOXA9 possuem frequência de recorrência entre 50 à 60% dos alvos (Figura 17).

Além disso, observa-se que há heterogeneidade de associação entre a expressão dos alvos e os genes HOX em cada tipo tumoral, logo os genes HOX possuem tendências tanto de ativar quando reprimir a expressão de genes alvos no mesmo tumor ou ainda em tumores diferentes (Figura 17). Acredita-se que esta característica ocorra principalmente por mais de 95% dos alvos serem identificados a partir de *enhancers*.

Contudo, apesar dos genes HOX possuírem muitos alvos em comum (Figura 17), eles podem agir de forma independente em cada câncer. O gene HOXA1, por exemplo, possui como alvos mais associados os genes DDX49 ($R=0,5164955$, $p\text{-valor}=0.000012$) e CKAP2L ($R=0,5034998$, $p\text{-valor}=0.00000762$) em LUAD, como é possível observar na Figura 17. A depleção do gene DDX49 levou a níveis mais baixos de SOX2 e OCT3/4 em paralelo com um aumento em NANOG e CD34 (Apostolou et al., 2015), fatores de transcrição responsáveis pela manutenção de pluripotência e auto-renovação em células estaminais embrionárias (Ling et al., 2012). Já o gene CKAP2 é um marcador prognóstico independente para sobrevivência livre de recaídas em câncer de mama em estágio inicial e poderia potencialmente substituir o índice de atividade mitótica na avaliação clínica da

atividade de proliferação. Além disso, resultados sugerem que o significado prognóstico da atividade de proliferação difere entre os vários subgrupos de câncer de mama (Kim et al., 2014), embasando a hipótese do gene HOXA1 super expresso promover modulações favoráveis ao desenvolvimento e proliferação tumoral já que regula este gene de forma positiva.

Figura 17. Heatmap dos valores de correlação de HOX com seus alvos (R). Quadrantes pretos podem representar correlações que não são significativas, alvos que não foram considerados como diferencialmente expressos em determinado tumor ou que o valor de R absoluto é menor que 0.2.

O gene HOXA2 detém os genes ZEB2 ($R=0,6384907$; $p\text{-valor}=0,001428411$) e STK10 ($R=0,5800566$; $p\text{-valor}=0,001018799$) em LUAD e o gene ARHGAP30 ($R=-0,5920311$; $p\text{-valor}=2,717468e-11$) em KIRC como seus alvos mais correlacionados (Figura 16). O gene ZEB2 é um fator de transcrição chave na TEM (Larsen et al., 2016). O aumento de ZEB2 tem sido associado ao alto grau tumoral em adenocarcinomas de pulmão (Dohadwala et al., 2006) e metástase linfática ou distante em carcinomas de células escamosas pulmonares (Zhang, J. et al., 2013). O HOXA2, bem como o ZEB2 encontram-se menos expressos no LUAD em comparação ao tecido normal e por este motivo estariam modulando de forma negativa a TEM. Resultados sugerem que STK10 funciona como um gene supressor de tumor (Fukumura et al., 2013) e que a expressão do gene ArhGAP30 é importante para acetilação da p53 e sua ativação funcional em carcinoma colorretal (Wang, J. et al., 2014). Constata-se que o gene HOXA2 detém potencial para ativar fatores pró-tumorais, todavia como está menos expresso em tumores modula processos oncogênicos de forma a suprimir desenvolvimento do tumor. Levanta-se a hipótese que o HOXA1 e HOXA2 são ativadores e/ou responsáveis pela manutenção de células tronco tumorais de BRCA e LUAD.

O gene HOXA9 está mais associado aos alvos TMEM43 ($R=-0,4771838$; $p\text{-valor}=3,650307e-06$) e SULF2 ($R=-0,4698152$; $p\text{-valor}=1,454384e-05$) em PRAD e CDC20B ($R=-0,4181263$; $p\text{-valor}=2,195310e-09$) em BRCA (Figura 17). A deficiência na expressão do gene TMEM43 resulta no defeito de indução da ativação mitógena de NF- κ B e progressão tumoral induzida por EGFR (Jiang et al., 2017). Sulf-2, proteína codificada pelo gene SULF2, é uma sulfatase que modifica o estado de sulfactação de proteoglicanos de sulfato heparano (HSPGs) na parte externa das células, regulando uma série de vias críticas de sinalização (Rosen e Lemjabbar-Alaoui, 2010). O gene CDC20B produz a proteína que em conjunto ao sub complexo E3 ubiquitina ligase (APC) regula a progressão do ciclo celular e é reportada como o oncogene (Wang, L. et al., 2015). Apesar do HOXA9 apresentar-se menos expresso em BRCA em comparação ao tecido normal ele possui super expressão em PRAD, indicando que o papel do gene HOXA9 na carcinogênese é modulado de acordo com o tipo celular. Especula-se que no câncer de mama há a tendência desse gene

agir como um supressor tumoral, enquanto em PRAD ele aparenta atuar como oncogene.

Os alvos mais associados ao HOXA13 são FIP1L1 em HNSC ($R=0,4937646$; $p\text{-valor}=0,0005093841$) e LUAD ($R=0,4727574$; $p\text{-valor}=0.0066523142$) e ITGA5 ($R=0,4391912$; $p\text{-valor}=1,555174e-05$) em LIHC (Figura 16). O gene FIP1L1 codifica uma subunidade do Fator de especificação de clivagem e poliadenilação que regula o *splicing* alternativo de mRNAs precursores (pré-mRNA) (Misra et al., 2015). Em contrapartida o gene ITGA5, codifica a proteína v-integrina que está envolvida em processos essenciais para o crescimento do tumor e metástase, como a angiogênese (Van Der Horst et al., 2014). Nota-se que o gene HOXA13 detém potencial ação de oncogene, uma vez que a alteração dos eventos de *splicing* na célula está associada a processos envolvidos na carcinogênese.

Um grande número dos genes da família HOXB (HOXB1, HOXB2 e os genes HOXB4-8) possuem altíssima associação positiva com o alvo CAPN8 principalmente no KIRC (Figura 16). O gene CAPN8 codifica a proteína Capaína 8, uma cisteína protease ativada por cálcio que quando super expressa participa no desenvolvimento de lesão glomerular imune (Peltier et al., 2006). Sugere-se então que esses genes HOX estão envolvidos na ativação desse processo carcinogênico.

O HOXB13 regula de forma significativa os genes IL18R1 ($R=-0,7072776$; $p\text{-valor}=3,063133e-16$), NKX3 ($R=0,9696986$; $p\text{-valor}=1,870042e-43$), KRT24 ($R=-0,6768244$; $p\text{-valor}=1,911897e-12$) em PRAD. O gene IL18R1 é um receptor que se liga especificamente à interleucina 18 (IL18) é secretada por células tumorais da próstata em resposta à IFN-gama do microambiente do tumoral, atuando como um fator autocrino/parácrino para o tumor (Lebel-Binay et al., 2003). O HOXB13 estaria diminuindo níveis do gene IL18R1 por apresentar-se mais expresso em PRAD, atuando como possível supressor tumoral. Da mesma forma o gene NKX3 considerado um supressor tumoral de próstata (Gurel et al., 2010), regulado positivamente pelo HOXB13, em conjunto à regulação negativa da queratina produzida pelo gene KRT24 que foi relatada como moduladora do processo de invasão e metástase de células cancerosas (Karantza, 2011), estaria constatando mais uma vez o potencial do gene HOXB13 ser um possível supressor tumoral.

Três principais alvos foram identificados em HOXC9, o gene RGS1 ($R=0,7182053$; $p\text{-valor}=7,725665e-04$), ARPC5 ($R=-0,6240761$; $p\text{-}$

valor=6,937663e-06) e KIF14 ($R=-0,6657918$; p-valor=6,424255e-10) em KIRC (Figura 16). O gene RGS1 aparenta regular a progressão de vários tumores (Sethakorn e Dulin, 2013), enquanto o gene ARPC5 contribui na migração e invasão celular (Kinoshita et al., 2012) e o gene KIF14, através do recrutamento de moléculas de adesão para a membrana celular modulando propriedades celulares adesivas, migratórias e invasivas, inibe o crescimento tumoral e metástase em adenocarcinomas pulmonares (Hung et al., 2013). Assim é possível caracterizar o gene HOXC9 como um provável oncogene.

4.5 Análise de alvos de HOX em vias e processos associados ao câncer

Os genes HOX, analisados em vários tumores, podem enriquecer diferentes vias biológicas importantes para crescimento e progressão tumoral. Na Figura 18 nota-se que 9 vias biológicas do KEGG foram enriquecidas entre 11 genes HOX. A via de sinalização cGMP está enriquecida através dos genes CNGA1 e GUCY1B3. O gene GUCY1B3 codifica para a subunidade beta da guanilato ciclase (sGC) que é um receptor citosólico onipresente ativado pelo estímulo do óxido nítrico para produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Zaccolo e Movsesian, 2007). O cGMP modula a inotropia e respostas metabólicas através da ativação de seus efetores a jusante, a proteína quinase G (PKG) e canais cíclicos nucleotídicos. A PKG, por sua vez, pode desencadear processos como a vasodilatação, diferenciação celular, proliferação celular e apoptose em diferentes tecidos (Fajardo et al., 2014). A baixa-expressão de GUCY1B3 em células de glioma demonstrou que cGMP é um mediador a montante da expressão de VEGF e que as guanilato ciclases solúveis podem ser as moléculas alvo para o controle da neo-vascularização (Saino et al., 2004). Em contra-partida, observa-se que a via do complexo SCF-FBW7 está sendo enriquecida pelo gene FBW7 nos mesmos genes HOX. Esta ubiquitina ligase é um supressor tumoral conhecido, envolvido no crescimento, proliferação e diferenciação celular (Wang, L. et al., 2014). Ao passo que os genes HOXA10, HOXA11, HOXB6 e HOXD1 regulam o gene GUCY1B3 de forma positiva em Carcinoma de Tireóide, sugerindo função de oncogene, eles também regulam de forma positiva o gene FBW7 em THCA, não sendo possível caracterizar o perfil de modulação desses genes no Carcinoma de Tireóide. Em contrapartida, o gene FBW7 é regulado negativamente pelos genes super expressos HOXA10, HOXA11 e HOXD1 em

HNSC, sugerindo atividade pró-tumoral, uma vez que diminui a expressão do gene FBW7.

A via do complexo GINS está enriquecida pelo alvo GINS4 (Figura 17). Este gene codifica a subunidade do complexo GINS, SLD5, essencial para os estágios de iniciação e alongamento do processo de replicação a partir do complexo CDC45 MCM (Macneill, 2010). A segmentação do gene SLD5 conduziu ao distúrbio da proliferação do epiblasto e resultou em letalidade embrionária precoce de camundongos (Mohri et al., 2013). Além disso, o *knockdown* de SLD5 usando RNA interferente resultou na redução do crescimento celular tanto *in vitro* quanto em modelo xenográfico *in vivo*, sugerindo atividade pró-tumoral (Yamane et al., 2016) (Ogo et al., 2015).

Figura 18. Vias biológicas enriquecidas pelos alvos dos genes HOX no banco de dados KEGG. A porcentagem de alvos enriquecidos em cada via bem como o valor de p-ajustado ao FDR estão representados pelos tamanho e coloração dos pontos. Está indicado entre parênteses o número de alvos totais para cada genes HOX.

O gene MAPK10 codifica a proteína JNK3 que possui atuação específica sob o tipo celular que está sendo expresso para integrar sinais que afetem a proliferação diferenciação, sobrevivência e migração celular (Wagner e Nebreda, 2009). Os genes HOXA9, HOXA13 e HOXC8 regulam positivamente este gene indicando potencial proliferativo desses genes.

O gene HOXA6 está modulando a expressão do complexo LSM1-7 negativamente, a partir das proteínas LSM1, LSM5, LSM6. A baixa regulação do LSm1 resulta em uma maior estabilidade de mRNA. LSm1 é um membro do complexo LSm1-7 que se associa com a extremidade 3' do mRNA e promove a remoção da *cap* 5' do RNA pelo complexo DCP1-DCP2 e subsequente degradação pela exonuclease XRN1. A expressão ectópica de LSm1 leva a um fenótipo de transformação tumoral aumentado, enquanto a regulação da expressão por siRNA

inibe a transformação tumoral. Essa modulação dos níveis de LSM1 no câncer de pulmão leva à mudanças no metabolismo do RNA que aumentam o volume do mRNA através de genes envolvidos na degradação do mRNA mas também diminuem a expressão de genes que controlam o processamento do RNA nuclear (Watson et al., 2008). O gene HOXA6 possui o potencial inibidor sob estes genes, todavia ele encontra-se menos expresso nos tumores e assim, apesar de exercer provável função de supressor tumoral, sua baixa expressão induz a alta expressão dos genes LSM1, LSM5, LSM6.

Além das vias biológicas, 6 genes HOX podem atuar conjuntamente em 8 processos biológicos já descritos (Figura 19), muitas vezes enriquecidas pelo mesmo grupo de genes. Os alvos PDGFRA, RBPJ, SGCB, SORBS2, CSRP3 e NEBL, por exemplo, estão enriquecidos nos processos de desenvolvimento e diferenciação de células cardíacas. O gene HOXB7 diretamente ativa a expressão dos genes FGF2, VEGFA, IL8, CXCL1 e ANG2 em várias linhagens celulares, sendo considerado um gene pró-vascularização (Kachgal et al., 2012). Possivelmente essa ativação está relacionada aos alvos apresentados. Os genes HOXA7, HOXA10, HOXA11, HOXB6, e HOXD1 possuem associação negativa com o alvo SORBS2 (Figura 17) em diversos tumores. Este gene foi demonstrado como indutor de senescência em fibroblastos e queratinócitos (Liesenfeld et al., 2013), e sua baixa expressão nos tumores sugere escape à senescência promovidos por estes genes HOX.

Resposta ao estresse oxidativo é um processo enriquecido principalmente pelos alvos GUCY1B3, PDGFRA, SOD3 e TPM1 no gene HOXB6. O gene SOD3 codifica a proteína Extracelular Superóxido dismutase que, quando super-expressa, reduz a concentração de ânion superóxido e aumenta a ativação de quinase mitogênica, sugerindo que a SOD3 poderia ter características de suporte vital. A hipótese é ainda reforçada pelas observações que mostram aumento significativo da mortalidade em camundongos nocaute condicionais. No entanto, no câncer, a SOD3 pode tanto aumentar quanto diminuir a proliferação e a sobrevivência celular dependendo do sistema modelo utilizado (Laukkanen, 2016). À vista disso, apesar do gene HOXB6 regular positivamente o SOD3 em THCA e estarem menos expressos no câncer a implicação é de difícil compreensão.

A regulação da via de sinalização de citocinas pelo gene HOXC se dá,

principalmente, pelos genes GAS6, IRAK3, PADI2 e PELI3. O papel do gene GAS6 tem sido destacado em processos de proliferação, apoptose, ferrocitose, migração de leucócitos, sequestro e agregação de plaquetas em múltiplos tipos de câncer (Wu et al., 2017). A interação Gas6-Axl promove a atividade mitogênica em linhagens celulares de câncer de próstata humano metastático indiferenciadas induzindo a fosforilação de Akt e MAPK (Sainaghi et al., 2005) e possui correlação positiva com o gene HOXC9. Por outro lado, os outros 3 genes possuem associação negativa com o gene HOXC9. O gene IRAK3 atua na resposta imune inata, medeia a tolerância imune e é um inibidor potente da sinalização TLR/IL1R. Sua diminuição acarreta em aumento de processo inflamatório (Kesselring et al., 2016). O gene PADI2 suprime a proliferação de células epiteliais do cólon por meio da catálise da citrulinização protéica e a regulação negativa da expressão de PADI2 pode contribuir para a carcinogênese do cólon (Funayama et al., 2017). Esses processos e a forma de regulação do HOXC9 com esses alvos reiteram a hipótese que esse gene é um modulador pro-tumorigênico.

Figura 19. Ontologias de processos biológicos enriquecidas pelos alvos dos genes HOX. A porcentagem de alvos enriquecidos em cada processo bem como o valor de p-ajustado ao FDR estão representados pelos tamanho e coloração dos pontos. Está indicado entre parênteses o número de alvos totais para cada genes HOX.

Estudos sugerem que os agrupamentos de genes HOX exibem padrões

característicos de expressão em rim e fornecem uma indicação de que a regulação coordenada dos genes HOX podem desempenhar um papel importante na organogênese renal (Cillo et al., 1992). A expressão ectópica de HOXB4 foi mostrada como indutora renal na mesoderma intermediária e não-intermediária sugerindo que o padrão ao longo do eixo A-P do cordão nefrogênico pode ser controlado por genes HOX (Preger-Ben Noon et al., 2009).

A alteração da expressão dos genes HOX observada em KIRC caracteriza-se pela super-expressão dos genes HOXA3, HOXA4, HOXA13, HOXC13 e HOXD13 e baixa expressão dos genes HOXA2, HOXA5-9, HOXA11, HOXB1-3, HOXB5-9, HOXC4-5, HOXC9, HOXD1-4, HOXD3, HOXD7-8 e HOXD10-11. Na via de câncer (hsa05200) esses genes, através da regulação dos seus alvos, controlam principalmente processos de interação com a matriz extra-celular, escape a apoptose e angiogênese.

Figura 20. Vias em câncer (hsa05200). A escala de cores representa os valores de $\log_2$ do *fold-change* da expressão dos alvos associados significativamente aos genes HOX diferencialmente expressos.

A matriz extracelular (ECM) consiste em uma mistura complexa de macro moléculas estruturais e funcionais que desempenham um papel importante na morfogênese dos tecidos e órgãos e na manutenção da estrutura e função celular e tecidual. As interações específicas entre células e ECM são mediadas por moléculas transmembranares, principalmente integrinas e também por proteoglicanos, CD36 ou outros componentes associados à superfície celular. Essas interações são reguladas por genes HOX (Figura 20) e levam a um controle direto ou indireto das atividades celulares, como adesão, migração, diferenciação, proliferação e apoptose. Além disso, as integrinas funcionam como mecanorreceptores e fornecem uma ligação física transmissora de força entre o ECM e o citoesqueleto. O gene HOXA13 regula positivamente a expressão de LAMA4 e o gene HOXB1 possui associação negativa com o COL9A2 (Figura 17). No entanto, em KIRC a expressão de HOXB1 é zerada entre os pacientes e desta forma leva a diminuição da expressão do COL9A2 no tumor (Figura 21).

Figura 21. Interação entre receptores ECM (hsa04512). A escala de cores representa os valores de $\log_2$ do *fold-change* da expressão dos alvos associados significativamente aos genes HOX diferencialmente expressos.

O inibidor NF-kappa-B alpha (NFKBIA) é regulador antagônico ao gene HOXA6 e desta maneira apresenta-se mais expresso em KIRC. A ativação do inibidor de NF-κB normalmente resulta na elevação da regulação de genes anti-apoptóticos, proporcionando assim mecanismo de sobrevivência celular para resistir ao estresse fisiológico que desencadeia a resposta inflamatória. Além disso, NF-κB induz citocinas que regulam a resposta imune (como TNFα, IL-1, IL-6 e IL-8), bem como moléculas de adesão, que levam ao recrutamento de leucócitos para locais de inflamação. Além do seu papel na imunidade inata, a sinalização de NF-κB mostrou controlar uma grande variedade de outros processos celulares bem conservados, incluindo a proliferação celular (La Rosa et al., 1994; Guttridge et al., 1999) e a apoptose (Perkins, 1997). A contribuição da inflamação em geral e por NF-κB para a iniciação e progressão do câncer é múltiplo e complexa. É postulado que a resposta imune inata de neutrófilos que liberam espécies reativas de oxigênio para matar agentes patogênicos invasores pode causar danos ao DNA e, portanto, gerando mutações genéticas como efeitos colaterais, desencadeando a iniciação do tumor (Liou e Storz, 2010). Além disso, a sinalização de NF-κB mostrou contribuir para a progressão do câncer ao controlar a TEM e a metástase (Huber et al., 2004). O último é frequentemente associado a uma regulação ascendente de metaloproteinases de matriz (MMPs), afrouxando a matriz extracelular para uma evasão de células cancerígenas. Finalmente, o NF-κB também pode contribuir para a progressão do tumor através do controle da vascularização de tumores através de uma regulação positiva do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e seus receptores (Xie et al., 2010; Hoesel e Schmid, 2013). À vista disso, acredita-se que o gene HOXA6 atua como modulador contrário à formação do KIRC.

O gene HOXA6 também regula a Elongina C (ELOC) de forma negativa. A alta expressão de ELOC acarreta em diminuição dos níveis de sub-unidades dos fatores induzíveis da hipoxia, como HIF-α e HIF-2α, que são fundamentais para a degradação mediada pela ubiquitina (Iliopoulos et al., 1996; Brugarolas e Kaelin, 2004). O HIF1A é regulado positivamente pelo gene HOXC9, ambos os genes pouco expressos em KIRC. Existem múltiplos genes a jusante, como Glut 1 (transporte de glicose), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, crescimento de vasos

sanguíneos), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante (TGF- α), o qual o HIF regula. Muitos dos receptores para genes regulados por HIF são os alvos das novas abordagens terapêuticas específicas para o carcinoma renal de células claras (Linehan, 2002). Novamente existem indícios da atuação do gene HOXA6 como supressor tumoral e do gene HOXC9 atuar como provável oncogene.

O gene HOXA4, em KIRC, regula de forma positiva o gene PIGF (Figura 17). Embora o VEGF seja um dos fatores angiogênicos mais frequentemente expressos em tumores, quando o PIGF é altamente expresso, transmite seu sinal através do Flt1, estimulando as fosforilações de resíduos de tirosina de Flt1 específicos e, assim, induz a expressão de diferentes genes alvo a jusante. O PIGF também amplifica a transdução de sinal mediada pelo VEGF através do VEGFR2 (também conhecido como Flk1) induzindo as transfosforilações dos resíduos de tirosina de Flk1. Além disso, o PIGF desloca o VEGF-A do Flt1, que libera VEGF-A e permite ativar o Flk1 e melhorar a angiogênese orientada por VEGF, sendo um modo de resistência à anti angiogênicos (Kim et al., 2012) (Eriksson et al., 2002). Consequente, sugere-se neste trabalho que o PIGF em KIRC contribui positivamente com a angiogênese por intermédio de HOXA4 (Figura 20).

O gene CTBP1 é regulado de forma negativa pelo gene HOXB7. A sua super expressão é conhecida por ser pró-tumorigênica e afeta a regulação de redes de genes associadas a "marcas de câncer" e ao comportamento maligno, incluindo aumento da sobrevivência celular, proliferação, migração, invasão e TEM (Blevins et al., 2017). Por fim, novamente sugere-se que o HOXB7 é um potencial oncogene.

5. CONCLUSÕES

A super expressão dos genes HOX em cânceres está associada à localização dos tumores ao longo do eixo ântero-posterior do corpo humano e à localização dos genes HOX dentro do agrupamento gênico.

Os alvos de .HOX foram identificados com sucesso, revelando um modelo de frequência dos picos de ligação no DNA associados à preferência de ligação em regiões promotoras e em regiões distais intergênicas.

O potencial de associação da expressão dos alvos dos genes HOX se dá de forma específica entre os tumores, ou seja, a recorrência de associação dos alvos

entre os tumores é baixa. Dessa forma os genes HOX possuem atividade variável de acordo com o tumor e não é possível a sugestão de sua atividade como onco-gene ou supressor tumoral de forma generalizada.

Apesar de vias gerais de atuação dos genes HOX terem sido relatadas na literatura, inclusive no câncer, os alvos específicos que estão regulando estes processos foram descritos, de forma global, pela primeira vez neste trabalho.

Os valores mais altos de correlação dos alvos com os genes HOX correspondem à genes envolvidos principalmente na TEM, angiogênese, proliferação e diferenciação celular.

6. REFERÊNCIAS

ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 10, p. 777-85, Oct 2002. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking).

ABE, M. et al. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. **Oncol Rep**, v. 15, n. 4, p. 797-802, Apr 2006. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335X (Linking).

AGRAWAL, P. et al. Genome-level identification of targets of Hox protein Ultrabithorax in Drosophila: novel mechanisms for target selection. **Sci Rep**, v. 1, 2011. ISSN 2045-2322 (Electronic).

AKINCILAR, S. C.; UNAL, B.; TERGAONKAR, V. Reactivation of telomerase in cancer. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 8, p. 1659-70, Apr 2016. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805692/pdf/18_2016_Article_2146.pdf >.

ALHARBI, R. A. et al. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. **Leukemia**, v. 27, n. 5, p. 1000-8, Apr 2013. ISSN 1476-5551 (Electronic) 0887-6924 (Linking).

ALLEN, T. D. et al. TALE homeoproteins as HOX11-interacting partners in T-cell leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 39, n. 3-4, p. 241-56, Oct 2000. ISSN 1042-8194 (Print) 1026-8022 (Linking).

ALVARADO-RUIZ, L. et al. HOXA9 is Underexpressed in Cervical Cancer Cells and its Restoration Decreases Proliferation, Migration and Expression of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Genes. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 3, p. 1037-47, 2016. ISSN 2476-762X (Electronic) 1513-7368 (Linking).

APOSTOLOU, P.; TOLOUDI, M.; PAPASOTIRIOU, I. Identification of genes involved in breast cancer and breast cancer stem cells. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 7, p. 183-91, 2015. ISSN 1179-1314 (Electronic).

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet**, v. 25, n. 1, p. 25-9, May 2000. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037419/pdf/nihms-269796.pdf> >.

AUBIN, J. et al. Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. **Dev Biol**, v. 192, n. 2, p. 432-45, Dec 15 1997. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0012160697987467/1-s2.0-S0012160697987467-main.pdf?_tid=733d2efe-4a12-11e7-a4f7-00000aab0f01&acdnat=1496683056_72af93862732b8266fc52dedf9133a8e >.

BACHAR, A. R. et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. **Cardiovasc Res**, v. 88, n. 2, p. 360-6, Nov 01 2010. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2952532/pdf/cvq191.pdf> >.

BAILEY, T. L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**, v. 2, p. 28-36, 1994. ISSN 1553-0833 (Print) 1553-0833 (Linking).

BARRETT, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D991-5, Jan 2013. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531084/pdf/gks1193.pdf> >.

BEH, C. Y. et al. Roles of cofactors and chromatin accessibility in Hox protein target specificity. **Epigenetics & Chromatin**, v. 9, n. 1, p. 1, 2016. ISSN 1756-8935. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13072-015-0049-x> >.

BELL, O. et al. Determinants and dynamics of genome accessibility. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 8, p. 554-64, Jul 12 2011. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking).

BELTON, J. M. et al. Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. **Methods**, v. 58, n. 3, p. 268-76, Nov 2012. ISSN 1095-9130 (Electronic) 1046-2023 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874846/pdf/nihms418977.pdf> >.

BERGER, M. F. et al. Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences. **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1266-76, Jun 27 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

BERGGREN, P. et al. Detecting homozygous deletions in the CDKN2A(p16(INK4a))/ARF(p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real-time quantitative PCR. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 1, p. 235-42, Jan 2003. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clinres/9/1/235.full.pdf> >.

BERNSTEIN, B. E. et al. The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1045-8, Oct 2010. ISSN 1546-1696 (Electronic) 1087-0156 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607281/pdf/nihms-452871.pdf> >.

BERRY, M.; GEHRING, W. Phosphorylation status of the SCR homeodomain determines its functional activity: essential role for protein phosphatase 2A,B'. **EMBO J**, v. 19, n. 12, p. 2946-57, Jun 15 2000. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://embojnl.embopress.org/content/embojnl/19/12/2946.full.pdf> >.

BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. HOX genes and their role in the development of human cancers. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 8, p. 811-23, Aug 2014. ISSN 1432-1440 (Electronic) 0946-2716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996520> >.

BLEVINS, M. A.; HUANG, M.; ZHAO, R. The Role of CtBP1 in Oncogenic Processes and Its Potential as a Therapeutic Target. **Mol Cancer Ther**, v. 16, n. 6, p. 981-990, Jun 2017. ISSN 1538-8514 (Electronic) 1535-7163 (Linking).

BODEY, B. et al. Immunocytochemical detection of homeobox B3, B4, and C6 gene product expression in lung carcinomas. **Anticancer Res**, v. 20, n. 4, p. 2711-6, Jul-Aug 2000. ISSN 0250-7005 (Print) 0250-7005 (Linking).

BOEVA, V. Analysis of Genomic Sequence Motifs for Deciphering Transcription Factor Binding and Transcriptional Regulation in Eukaryotic Cells. **Front Genet**, v. 7, 2016. ISSN 1664-8021 (Electronic).

BOGUE, C. W. et al. Identification of Hox genes in newborn lung and effects of gestational age and retinoic acid on their expression. **Am J Physiol**, v. 266, n. 4 Pt 1, p. L448-54, Apr 1994. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://ajplung.physiology.org/content/266/4/L448> >.

BOJOVIC, B. et al. Alternative lengthening of telomeres in cancer stem cells in vivo. **Oncogene**, v. 34, n. 5, p. 611-20, Jan 29 2015. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135038/pdf/nihms551119.pdf> >.

BORROW, J. et al. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. **Nat Genet**, v. 12, n. 2, p. 159-67, Feb 1996. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking).

BRENDOLAN, A. et al. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. **Development**, v. 132, n. 13, p. 3113-26, Jul 2005. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/132/13/3113.full.pdf> >.

BROMLEIGH, V. C.; FREEDMAN, L. P. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. **Genes Dev**, v. 14, n. 20, p. 2581-6, Oct 15 2000. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317001/pdf/X8.pdf> >.

BRUGAROLAS, J.; KAELEN, W. G., JR. Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. **Cancer Cell**, v. 6, n. 1, p. 7-10, Jul 2004. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108\(04\)00183-7.pdf](http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(04)00183-7.pdf) >.

BRUHL, T. et al. Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation. **Circ Res**, v. 94, n. 6, p. 743-51, Apr 02 2004. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org/content/circresaha/94/6/743.full.pdf> >.

CANTILE, M. et al. Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. **Oncogene**, v. 22, n. 41, p. 6462-8, Sep 25 2003. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/onc/journal/v22/n41/pdf/1206808a.pdf> >.

CANTILE, M. et al. Expression of lumbosacral HOX genes, crucial in kidney organogenesis, is systematically deregulated in clear cell kidney cancers. **Anticancer Drugs**, v. 22, n. 5, p. 392-401, Jun 2011. ISSN 1473-5741 (Electronic) 0959-4973 (Linking).

CANTILE, M. et al. Increased HOX C13 expression in metastatic melanoma progression. **J Transl Med**, v. 10, p. 91, May 14 2012. ISSN 1479-5876 (Electronic) 1479-5876 (Linking).

CANTILE, M. et al. Aberrant expression of posterior HOX genes in well differentiated histotypes of thyroid cancers. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 21727-40, Nov 01 2013. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking).

CARAPUCO, M. et al. Hox genes specify vertebral types in the presomitic mesoderm. **Genes Dev**, v. 19, n. 18, p. 2116-21, Sep 15 2005. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221883/pdf/00192116.pdf> >.

CARE, A. et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 9, p. 4842-51, Sep 1996. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://mcb.asm.org/content/16/9/4842.full.pdf> >.

CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69 Suppl 3, p. 4-10, 2005. ISSN 0030-2414 (Print) 0030-2414 (Linking).

CERAMI, E. et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discov**, v. 2, n. 5, p. 401-4, May 2012. ISSN 2159-8290 (Electronic) 2159-8274 (Linking). Disponível em: < <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/candisc/2/5/401.full.pdf> >.

CHANUT-DELALANDE, H. et al. Shavenbaby couples patterning to epidermal cell shape control. **PLoS Biol**, v. 4, n. 9, p. e290, Sep 2006. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking).

CHARBONEAU, A. et al. Pbx1 is required for Hox D3-mediated angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 8, n. 4, p. 289-96, 2005. ISSN 0969-6970 (Print) 0969-6970 (Linking).

CHARIOT, A. et al. CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. **Oncogene**, v. 18, n. 27, p. 4007-14, Jul 08 1999. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/1462/1/Chariot%20et%20al.%20Oncogene%201999.pdf> >.

CHEN, H.; BOUTROS, P. C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 35, Jan 26 2011. ISSN 1471-2105 (Electronic) 1471-2105 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041657/pdf/1471-2105-12-35.pdf> >.

CHEN, J. et al. HoxB3 promotes prostate cancer cell progression by transactivating CDCA3. **Cancer Lett**, v. 330, n. 2, p. 217-24, Apr 28 2013. ISSN 1872-7980 (Electronic) 0304-3835 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0304383512007136/1-s2.0-S0304383512007136-main.pdf?_tid=64c20892-63d4-11e6-a93c-00000aacb35e&acdnat=1471367635_23270d394d978a21725699c24a7bd9b5 >.

CHENG, W. et al. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. **Nat Med**, v. 11, n. 5, p. 531-7, May 2005. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking).

CHETTOUH, H. et al. Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors. **Cancer Res**, v. 73, n. 13, p. 3974-86, Jul 01 2013. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/73/13/3974.full.pdf> >.

CHIN, Y. P. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of humanin and its analogues in male rodents. **Endocrinology**, v. 154, n. 10, p. 3739-44, Oct 2013. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/endo/154/10/10.1210_en.2012-2004/1/endo3739.pdf?Expires=1502482599&Signature=Jll56gqy24msjv7LJ~RwYhXuRCt1LU4vcP7CcLN3peMc70 >.

2kjhIkxzZM56Ov4sP0xUCo9bcZbTannO2RM4EmbVz5ZFv0LNvCeWD3w8n8JJdwVbInF-TC3uDMwBuO~2DU0xHJjQsDw3VdmTsM46Ydud07r8h7BqovTK8jsvAfM8MpuwPAIIQNN7-t q V Z y p ~ G P y r u h X j R 4 P K 6 0 W i 2 a l b w d i s n - Y25HbyErcG9z0c2TWDp8EiRIakuAV1ftqHusVdqKgdAjvrXoaVkBraaXwKyMJ0~AMg1hYL0Y TN~BF7oMlcxkJ7IOkL57vWTYoUc7MqeBog47M3kT02wBB2KU6NQa5Q__&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPVAVW3Q >.

CHOO, S. W.; RUSSELL, S. Genomic approaches to understanding Hox gene function. **Adv Genet**, v. 76, p. 55-91, 2011. ISSN 0065-2660 (Print) 0065-2660 (Linking).

CHOO, S. W.; WHITE, R.; RUSSELL, S. Genome-wide analysis of the binding of the Hox protein Ultrabithorax and the Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. **PLoS One**, v. 6, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014778> <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0014778&type=printable> >.

CILLO, C. et al. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. **Int J Cancer**, v. 51, n. 6, p. 892-7, Jul 30 1992. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.2910510610/abstract> >.

CLARK, S. G.; CHISHOLM, A. D.; HORVITZ, H. R. Control of cell fates in the central body region of *C. elegans* by the homeobox gene *lin-39*. **Cell**, v. 74, n. 1, p. 43-55, Jul 16 1993. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(93\)90293-Y.pdf?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749390293Y%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90293-Y.pdf?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749390293Y%3Fshowall%3Dtrue) >.

COHN, L. B. et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. **Cell**, v. 160, n. 3, p. 420-32, Jan 29 2015. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

COLAPRICO, A. et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 8, p. e71, May 5 2016. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856967/pdf/gkv1507.pdf> >.

CREYGHTON, M. P. et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 50, p. 21931-6, Dec 14 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003124/pdf/pnas.201016071.pdf> >.

CROCKER, J. et al. Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p. 191-203, Jan 15 2015. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(14\)01518-9.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(14)01518-9.pdf) >.

D'HAESELEER, P. What are DNA sequence motifs? **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 4, p. 423-5, Apr 2006. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking).

DAFTARY, G. S.; TAYLOR, H. S. Endocrine regulation of HOX genes. **Endocr Rev**, v. 27, n. 4, p. 331-55, Jun 2006. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking).

DAFTARY, G. S. et al. Direct regulation of beta3-integrin subunit gene expression by HOXA10 in endometrial cells. **Mol Endocrinol**, v. 16, n. 3, p. 571-9, Mar 2002. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809 (Linking).

DE BARROS, E. L. B. R. et al. HOX genes: potential candidates for the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. **Tumour Biol**, v. 37, n. 11, p. 15087-15096, Nov 2016. ISSN 1423-0380 (Electronic) 1010-4283 (Linking). Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13277-016-5356-8> >.

DESCHAMPS, J. et al. Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse. **Int J Dev Biol**, v. 43, n. 7, p. 635-50, 1999. ISSN 0214-6282 (Print) 0214-6282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ijdb.ehu.es/web/descarga/paper/10668974> >.

DESCHAMPS, J.; VAN NES, J. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. **Development**, v. 132, n. 13, p. 2931-42, Jul 2005. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/132/13/2931.full.pdf> >.

DESCHAMPS, J.; WIJGERDE, M. Two phases in the establishment of HOX expression domains. **Dev Biol**, v. 156, n. 2, p. 473-80, Apr 1993. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking).

DHOMEN, N. et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. **Cancer Cell**, v. 15, n. 4, p. 294-303, Apr 07 2009. ISSN 1878-3686 (Electronic) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108\(09\)00074-9.pdf](http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(09)00074-9.pdf) >.

DINGER, M. E. et al. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. **Genome Res**, v. 18, n. 9, p. 1433-45, Sep 2008. ISSN 1088-9051 (Print) 1088-9051 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527704/pdf/1433.pdf> >.

DJEBALI, S. et al. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101-8, Sep 06 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v489/n7414/pdf/nature11233.pdf> >.

DOHADWALA, M. et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. **Cancer Res**, v. 66, n. 10, p. 5338-45, May 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/66/10/5338.full.pdf> >.

DOLLE, P. et al. Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homoeobox-containing genes during limb pattern formation. **Nature**, v. 342, n. 6251, p. 767-72, Dec 14 1989. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v342/n6251/abs/342767a0.html> >.

DONALDSON, I. J. et al. Genome-wide occupancy links Hoxa2 to Wnt-beta-catenin signaling in mouse embryonic development. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 9, p. 3990-4001, May 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking).

DUAN, Z. et al. A three-dimensional model of the yeast genome. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 363-7, May 20 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

DUBOULE, D. The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. **Bioessays**, v. 14, n. 6, p. 375-84, Jun 1992. ISSN 0265-9247 (Print) 0265-9247 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.950140606/abstract> >.

_____. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. **Dev Suppl**, p. 135-42, 1994.

DUBRULLE, J.; MCGREW, M. J.; POURQUIE, O. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 219-32, Jul 27 2001. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 1, p. 207-10, Jan 01 2002. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99122/pdf/gkf066.pdf> >.

EKKER, S. C. et al. The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins. **EMBO J**, v. 13, n. 15, p. 3551-60, Aug 01 1994. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking).

ERIKSSON, A. et al. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. **Cancer Cell**, v. 1, n. 1, p. 99-108, Feb 2002. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108\(02\)00028-4.pdf](http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(02)00028-4.pdf) >.

FAJARDO, A. M.; PIAZZA, G. A.; TINSLEY, H. N. The Role of Cyclic Nucleotide Signaling Pathways in Cancer: Targets for Prevention and Treatment. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 436-58, Mar 2014. ISSN 2072-6694 (Electronic). Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6694/6/1/436/pdf> >.

FAN, L. et al. Loss of E-cadherin promotes prostate cancer metastasis via upregulation of metastasis-associated gene 1 expression. **Oncol Lett**, v. 4, n. 6, p. 1225-1233, Dec 2012. ISSN 1792-1074 (Print) 1792-1074 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506747/pdf/ol-04-06-1225.pdf> >.

FAZLEABAS, A. T.; KIM, J. J.; STRAKOVA, Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review. **Placenta**, v. 25 Suppl A, p. S26-31, Apr 2004. ISSN 0143-4004 (Print) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < [http://www.placentajournal.org/article/S0143-4004\(04\)00028-1/pdf](http://www.placentajournal.org/article/S0143-4004(04)00028-1/pdf) >.

FUKUMURA, K. et al. STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function. **Oncol Rep**, v. 30, n. 4, p. 1542-8, Oct 2013. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking).

FUNAYAMA, R. et al. Protein-arginine deiminase 2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. **Cancer Sci**, v. 108, n. 4, p. 713-718, Apr 2017. ISSN 1349-7006 (Electronic) 1347-9032 (Linking).

GALANT, R.; CARROLL, S. B. Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 910-3, Feb 21 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

GALILI, T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3718-20, Nov 15 2015. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817050/pdf/btv428.pdf> >.

GAO, J.; MAZELLA, J.; TSENG, L. Hox proteins activate the IGFBP-1 promoter and suppress the function of hPR in human endometrial cells. **DNA Cell Biol**, v. 21, n. 11, p. 819-25, Nov 2002. ISSN 1044-5498 (Print) 1044-5498 (Linking). Disponível em: < http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/104454902320908469?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed >.

GEBELEIN, B.; MANN, R. S. Compartmental modulation of abdominal Hox expression by engrailed and sloppy-paired patterns the fly ectoderm. **Dev Biol**, v. 308, n. 2, p. 593-605,

Aug 15 2007. ISSN 0012-1606 (Print) 1095-564X (Electronic). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S001216060701041X/1-s2.0-S001216060701041X-main.pdf?_tid=533392f2-6b2c-11e7-b7e2-00000aab0f6c&acdnat=1500322558_ade09e841737b0a51f1e0504a59a6d0e >.

GEBELEIN, B.; MCKAY, D. J.; MANN, R. S. Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during *Drosophila* development. **Nature**, v. 431, n. 7009, p. 653-9, Oct 07 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

GEHRING, W. J. Homeo boxes in the study of development. **Science**, v. 236, n. 4806, p. 1245-52, Jun 05 1987. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/236/4806/1245.long> >.

Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D1049-56, Jan 2015. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking).

GERARD, M.; ZAKANY, J.; DUBOULE, D. Interspecies exchange of a Hoxd enhancer in vivo induces premature transcription and anterior shift of the sacrum. **Dev Biol**, v. 190, n. 1, p. 32-40, Oct 01 1997. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0012160697986796/1-s2.0-S0012160697986796-main.pdf?_tid=c0a916c2-47e1-11e7-8505-00000aab0f01&acdnat=1496442238_d9ba39bea0d81297cfb31d9a731c5a61 >.

GHELDOLF, A.; BEXX, G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 116, p. 317-36, 2013. ISSN 1878-0814 (Electronic) 1877-1173 (Linking).

GOLDMAN, M. et al. The UCSC Cancer Genomics Browser: update 2015. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D812-7, Jan 2015. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383911/pdf/gku1073.pdf> >.

GOLPON, H. A. et al. HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 955-66, Mar 2001. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850338/pdf/2544.pdf> >.

GONCALVES, C. S. et al. Transcriptional profiling of HOXA9-regulated genes in human glioblastoma cell models. **Genom Data**, v. 5, p. 54-8, Sep 2015. ISSN 2213-5960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4583997/pdf/main.pdf> >.

GONZALEZ-HERRERA, A. et al. Increased expression of HOXB2 and HOXB13 proteins is associated with HPV infection and cervical cancer progression. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 4, p. 1349-53, 2015. ISSN 2476-762X (Electronic) 1513-7368 (Linking).

GOUSTIN, A. S. et al. Growth factors and cancer. **Cancer Res**, v. 46, n. 3, p. 1015-29, Mar 1986. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/46/3/1015.full.pdf> >.

GRANT, C. E.; BAILEY, T. L.; NOBLE, W. S. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1017-8, Apr 01 2011. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3065696/pdf/btr064.pdf> >.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847-9, Sep 15 2016. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking).

GUREL, B. et al. NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 8, p. 1097-105, Aug 2010. ISSN 1532-0979 (Electronic) 0147-5185 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072223/pdf/nihms272269.pdf> >.

GUTTRIDGE, D. C. et al. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 8, p. 5785-99, Aug 1999. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).

HAMADA, J. et al. Overexpression of homeobox gene HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. **Int J Cancer**, v. 93, n. 4, p. 516-25, Aug 15 2001. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking).

HAN, H. et al. TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions. **Sci Rep**, v. 5, p. 11432, Jun 12 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464350/pdf/srep11432.pdf> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0092867400816839/1-s2.0-S0092867400816839-main.pdf?_tid=f47ca112-8e1a-11e5-851f-00000aacb360&acdnat=1447868392_f931dcfae9b6d1830f69e9990abb4dc3 >.

HASHIMOTO, Y. et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 11, p. 6336-41, May 22 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC33469/pdf/pq006336.pdf> >.

HAYASHIDA, T. et al. HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 3, p. 1100-5, Jan 19 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080567> >.

HEINONEN, H. et al. Identification of several potential chromatin binding sites of HOXB7 and its downstream target genes in breast cancer. **Int J Cancer**, v. 137, n. 10, p. 2374-83, Nov 15 2015. ISSN 0020-7136 (Print) 1097-0215 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744995/pdf/IJC-137-2374.pdf> >.

HERSHKO, A. Y. et al. Methylation of HoxA5 and HoxB5 and its relevance to expression during mouse development. **Gene**, v. 302, n. 1-2, p. 65-72, Jan 02 2003. ISSN 0378-1119 (Print) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111902010910> >.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v. 12, p. 86, 2013. ISSN 1476-4598 (Electronic).

HONG, C. S. et al. HOXB5 induces invasion and migration through direct transcriptional up-regulation of beta-catenin in human gastric carcinoma. **Biochem J**, v. 472, n. 3, p. 393-403, Dec 15 2015. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking).

HU, H. et al. Dysregulated expression of homeobox gene HOXA13 is correlated with the poor prognosis in bladder cancer. **Wien Klin Wochenschr**, v. 129, n. 11-12, p. 391-397, Jun 2017. ISSN 1613-7671 (Electronic) 0043-5325 (Linking).

HUANG, Y. et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 388-98, Jan 12 2012. ISSN 0006-4971 (Print) 1528-0020

(Electronic). Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/119/2/388.full.pdf> >.

HUBER, M. A. et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. **J Clin Invest**, v. 114, n. 4, p. 569-81, Aug 2004. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC503772/pdf/JCI0421358.pdf> >.

HUDRY, B. et al. Molecular insights into the origin of the Hox-TALE patterning system. **Elife**, v. 3, p. e01939, Mar 18 2014. ISSN 2050-084X (Electronic) 2050-084X (Linking).

HUNG, P. F. et al. The motor protein KIF14 inhibits tumor growth and cancer metastasis in lung adenocarcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61664, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

HUR, H. et al. HOXC9 Induces Phenotypic Switching between Proliferation and Invasion in Breast Cancer Cells. **J Cancer**, v. 7, n. 7, p. 768-73, 2016. ISSN 1837-9664 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860792/pdf/jcav07p0768.pdf> >.

HUR, H. et al. Analysis of HOX gene expression patterns in human breast cancer. **Mol Biotechnol**, v. 56, n. 1, p. 64-71, Jan 2014. ISSN 1559-0305 (Electronic) 1073-6085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820980> >.

HYMAN, E. et al. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. **Cancer Res**, v. 62, n. 21, p. 6240-5, Nov 01 2002. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/62/21/6240.full.pdf> >.

ILIOPOULOS, O. et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 20, p. 10595-9, Oct 01 1996. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57-74, Sep 06 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v489/n7414/pdf/nature11247.pdf> >.

IYER, V. R. et al. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 533-8, Jan 25 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

JACOBSEN, A. et al. Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 11, p. 1325-32, Nov 2013. ISSN 1545-9985 (Electronic) 1545-9985 (Linking).

JAFFE, L.; RYOO, H. D.; MANN, R. S. A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in Drosophila. **Genes Dev**, v. 11, n. 10, p. 1327-40, May 15 1997. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://genesdev.cshlp.org/content/11/10/1327.full.pdf> >.

JIANG, C. et al. TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Database issue, p. D137-40, Jan 2007. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899102/pdf/gkl1041.pdf> >.

JIANG, C. et al. TMEM43/LUMA is a key signaling component mediating EGFR-induced NF-kappaB activation and tumor progression. **Oncogene**, v. 36, n. 20, p. 2813-2823, May 18 2017. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking).

JIMÉNEZ, G.; PAROUSH, Z.; ISH-HOROWICZ, D. Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. **Genes Dev**, v. 11, n. 22, p. 3072-82, Nov 15 1997. ISSN 0890-9369 (Print). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316696/pdf/x13.pdf> >.

JOLMA, A. et al. DNA-binding specificities of human transcription factors. **Cell**, v. 152, n. 1-2, p. 327-39, Jan 17 2013. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

JUAN, A. H.; RUDDLE, F. H. Enhancer timing of Hox gene expression: deletion of the endogenous Hoxc8 early enhancer. **Development**, v. 130, n. 20, p. 4823-34, Oct 2003. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/130/20/4823.full.pdf> >.

KACHGAL, S.; MACE, K. A.; BOUDREAU, N. J. The dual roles of homeobox genes in vascularization and wound healing. **Cell Adh Migr**, v. 6, n. 6, p. 457-70, Nov 1 2012. ISSN 1933-6918 (Print) 1933-6926 (Electronic).

KANAI, M. et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. **Oncol Rep**, v. 23, n. 3, p. 843-51, Mar 2010. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking).

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan 01 2000. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102409/pdf/gkd027.pdf> >.

KANEHISA, M. et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. Database issue, p. D457-62, Jan 4 2016. ISSN 0305-1048 (Print) 1362-4962 (Electronic).

KARANTZA, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. **Oncogene**, v. 30, n. 2, p. 127-38, Jan 13 2011. ISSN 0950-9232 (Print) 1476-5594 (Electronic).

KARIYA, S. et al. Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. **Neuroreport**, v. 13, n. 6, p. 903-7, May 07 2002. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking).

KAWADA, M. et al. Stromal cells positively and negatively modulate the growth of cancer cells: stimulation via the PGE2-TNFalpha-IL-6 pathway and inhibition via secreted GAPDH-E-cadherin interaction. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119415, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4364666/pdf/pone.0119415.pdf> >.

KAZANETS, A. et al. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, n. 2, p. 275-88, Apr 2016. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking).

KESSELRING, R. et al. IRAK-M Expression in Tumor Cells Supports Colorectal Cancer Progression through Reduction of Antimicrobial Defense and Stabilization of STAT3. **Cancer Cell**, v. 29, n. 5, p. 684-96, May 09 2016. ISSN 1878-3686 (Electronic) 1535-6108 (Linking).

KIM, H. S. et al. Chromatin CKAP2, a new proliferation marker, as independent prognostic indicator in breast cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98160, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4041571/pdf/pone.0098160.pdf> >.

KIM, J. J. et al. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by FKHR and HOXA10 in primate endometrial cells. **Biol Reprod**, v. 68, n. 1, p. 24-30, Jan 2003. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking).

KIM, K. J.; CHO, C. S.; KIM, W. U. Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. **Exp Mol Med**, v. 44, n. 1, p. 10-9, Jan 31 2012. ISSN 1226-3613 (Print) 2092-6413 (Electronic).

KIN, T. et al. Humanin expression in skeletal muscles of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. **J Hum Genet**, v. 51, n. 6, p. 555-8, 2006. ISSN 1434-5161 (Print) 1434-5161 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/jhg/journal/v51/n6/pdf/jhg200684a.pdf> >.

KINOSHITA, T. et al. Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 (ARPC5) contributes to cell migration and invasion and is directly regulated by tumor-suppressive microRNA-133a in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 40, n. 6, p. 1770-8, Jun 2012. ISSN 1791-2423 (Electronic) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <https://www.spandidos-publications.com/ijo/40/6/1770/download> >.

KLEIN, L. E. et al. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 440, n. 2, p. 197-203, Oct 18 2013. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853355/pdf/nihms530179.pdf> >.

KMITA, M.; DUBOULE, D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 331-3, Jul 18 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

KNOSP, W. M. et al. HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. **Development**, v. 131, n. 18, p. 4581-92, Sep 2004. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/131/18/4581.full.pdf> >.

KONDO, T.; DUBOULE, D. Breaking colinearity in the mouse HoxD complex. **Cell**, v. 97, n. 3, p. 407-17, Apr 30 1999. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)80749-7.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)80749-7.pdf) >.

KROSL, J.; SAUVAGEAU, G. AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. **Oncogene**, v. 19, n. 45, p. 5134-41, Oct 26 2000. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/onc/journal/v19/n45/pdf/1203897a.pdf> >.

LA ROSA, F. A.; PIERCE, J. W.; SONENSHEIN, G. E. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 2, p. 1039-44, Feb 1994. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).

LAPPIN, T. R. et al. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. **Ulster Med J**, v. 75, n. 1, p. 23-31, Jan 2006. ISSN 0041-6193 (Print) 0041-6193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1891803/pdf/umj7501-023.pdf> >.

LARSEN, J. E. et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. **J Clin Invest**, v. 126, n. 9, p. 3219-35, Sep 01 2016. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004933/pdf/JCI76725.pdf> >.

LAUKKANEN, M. O. Extracellular Superoxide Dismutase: Growth Promoter or Tumor Suppressor? **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 3612589, 2016. ISSN 1942-0994

(Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880707/pdf/OMCL2016-3612589.pdf> >.

LAURENT, L. et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome Res**, v. 20, n. 3, p. 320-31, Mar 2010. ISSN 1549-5469 (Electronic) 1088-9051 (Linking). Disponível em: < <http://genome.cshlp.org/content/20/3/320.full.pdf> >.

LAWRENCE, H. J. et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1922-30, Mar 15 1997. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking).

LEBEL-BINAY, S. et al. IL-18 is produced by prostate cancer cells and secreted in response to interferons. **Int J Cancer**, v. 106, n. 6, p. 827-35, Oct 10 2003. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/ijc.11285/asset/11285ftp.pdf?v=1&t=j3wjmnpd&s=a8a797aec073a215db93ce357aedf6d194c11f74> >.

LEE, J. Y. et al. HOXB5 Promotes the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. **Int J Biol Sci**, v. 11, n. 6, p. 701-11, 2015. ISSN 1449-2288 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999793> >.

LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. **Nature**, v. 276, n. 5688, p. 565-70, Dec 07 1978. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 323, 2011. ISSN 1471-2105 (Electronic) 1471-2105 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163565/pdf/1471-2105-12-323.pdf> >.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754-60, Jul 15 2009. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking).

LI, W.; NOTANI, D.; ROSENFELD, M. G. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. **Nat Rev Genet**, v. 17, n. 4, p. 207-23, Apr 2016. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking).

LIAO, W. T. et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 11, p. 3569-78, Jun 01 2011. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking).

LIEBERMAN-AIDEN, E. et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. **Science**, v. 326, n. 5950, p. 289-93, Oct 09 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

LIESENFELD, M. et al. SORBS2 and TLR3 induce premature senescence in primary human fibroblasts and keratinocytes. **BMC Cancer**, v. 13, p. 507, Oct 29 2013. ISSN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819711/pdf/1471-2407-13-507.pdf> >.

LINEHAN, W. M. Editorial: Kidney cancer--a unique opportunity for the development of disease specific therapy. **J Urol**, v. 168, n. 6, p. 2411-2, Dec 2002. ISSN 0022-5347 (Print) 0022-5347 (Linking).

LING, G. et al. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. **Oncol Lett**, v. 4, n. 6, p. 1264-8, Dec 2012. ISSN 1792-1074 (Print) 1792-1082 (Electronic).

LIU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic Res**, v. 44, n. 5, p. 479-96, May 2010. ISSN 1029-2470 (Electronic) 1029-2470 (Linking).

LIU, H. et al. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 8, p. 3117-26, Apr 2005. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1069602/pdf/1709-04.pdf> >.

LO, Y. H. et al. Transcriptional Regulation by ATOH1 and its Target SPDEF in the Intestine. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 1, p. 51-71, Jan 2017. ISSN 2352-345X (Electronic).

LOHMANN, I. et al. The Drosophila Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 457-66, Aug 23 2002. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(02\)00871-1.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(02)00871-1.pdf) >.

LONGOBARDI, E. et al. Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. **Dev Dyn**, v. 243, n. 1, p. 59-75, Jan 2014. ISSN 1097-0177 (Electronic) 1058-8388 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/dvdy.24016/asset/asset/dvdy24016.pdf?v=1&t=j3k7i3jy&s=d5564457ed9a823f5ff99080ca2c321ed5453b8b> >.

LUO, W.; BROUWER, C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1830-1, Jul 15 2013. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3702256/pdf/btt285.pdf> >.

MACNEILL, S. A. Structure and function of the GINS complex, a key component of the eukaryotic replisome. **Biochem J**, v. 425, n. 3, p. 489-500, Jan 15 2010. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking).

MAKIYAMA, K. et al. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. **Oncol Rep**, v. 13, n. 4, p. 673-9, Apr 2005. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <https://www.spandidos-publications.com/or/13/4/673> >.

MANN, R. S.; LELLI, K. M.; JOSHI, R. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. **Curr Top Dev Biol**, v. 88, p. 63-101, 2009. ISSN 0070-2153 (Print) 0070-2153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810641/pdf/nihms-168546.pdf> >.

MANSOUR, M. A.; SENG, T. HOXD8 exerts a tumor-suppressing role in colorectal cancer as an apoptotic inducer. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 88, p. 1-13, Apr 27 2017. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking).

MARBACH, D. et al. Tissue-specific regulatory circuits reveal variable modular perturbations across complex diseases. **Nat Methods**, v. 13, n. 4, p. 366-70, Apr 2016. ISSN 1548-7105 (Electronic) 1548-7091 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4967716/pdf/nihms-802956.pdf> >.

MARRA, L. et al. Deregulation of HOX B13 expression in urinary bladder cancer progression. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 6, p. 833-9, Feb 01 2013. ISSN 1875-533X (Electronic) 0929-8673 (Linking).

MATSUURA, K. et al. Downregulation of the proapoptotic protein MOAP-1 by the UBR5 ubiquitin ligase and its role in ovarian cancer resistance to cisplatin. **Oncogene**, v. 36, n. 12, p. 1698-1706, Mar 23 2017. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447866/pdf/onc2016336a.pdf> >.

MEDINA-RIVERA, A. et al. RSAT 2015: Regulatory Sequence Analysis Tools. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. W1, p. W50-6, Jul 01 2015. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking).

MEI, S. et al. Cistrome Data Browser: a data portal for ChIP-Seq and chromatin accessibility data in human and mouse. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. D1, p. D658-D662, Jan 04 2017. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210658/pdf/gkw983.pdf> >.

MERMEL, C. H. et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. **Genome Biol**, v. 12, n. 4, p. R41, 2011. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218867/pdf/gb-2011-12-4-r41.pdf> >.

MILECH, N.; KEES, U. R.; WATT, P. M. Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 32, n. 3, p. 275-80, Nov 2001. ISSN 1045-2257 (Print) 1045-2257 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gcc.1190/abstract> >.

MILLER, G. J. et al. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. **Cancer Res**, v. 63, n. 18, p. 5879-88, Sep 15 2003. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/18/5879.full.pdf> >.

MISRA, A. et al. Global Promotion of Alternative Internal Exon Usage by mRNA 3' End Formation Factors. **Mol Cell**, v. 58, n. 5, p. 819-31, Jun 04 2015. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking).

MOHRI, T. et al. Requirement of SLD5 for early embryogenesis. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78961, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823970/pdf/pone.0078961.pdf> >.

MONICA, K. et al. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 6149-57, Dec 1991. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://mcb.asm.org/content/11/12/6149.full.pdf> >.

MORGAN, R. et al. Targeting HOX/PBX dimers in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 32322-32331, May 09 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking).

MORGAN, R. et al. HOX transcription factors are potential targets and markers in malignant mesothelioma. **BMC Cancer**, v. 16, p. 85, Feb 11 2016. ISSN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking).

MURAT, A. et al. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 18, p. 3015-24, Jun 20 2008. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking).

NAKAMURA, T. et al. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. **Nat Genet**, v. 12, n. 2, p. 154-8, Feb 1996. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/ng/journal/v12/n2/abs/ng0296-154.html> >.

NAORA, H. et al. Aberrant expression of homeobox gene HOXA7 is associated with mullerian-like differentiation of epithelial ovarian tumors and the generation of a specific autologous antibody response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15209-14, Dec 18

2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC65008/pdf/pq2601015209.pdf> >.

NELSON, C. E. et al. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. **Development**, v. 122, n. 5, p. 1449-66, May 1996. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/122/5/1449.full.pdf> >.

NEPH, S. et al. Circuitry and dynamics of human transcription factor regulatory networks. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1274-86, Sep 14 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(12\)00639-3.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(12)00639-3.pdf) >.

NEPH, S. et al. An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 83-90, Sep 06 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v489/n7414/pdf/nature11212.pdf> >.

NOYES, M. B. et al. Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites. **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1277-89, Jun 27 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

OGO, O. A. et al. The Zinc Finger Protein ZNF658 Regulates the Transcription of Genes Involved in Zinc Homeostasis and Affects Ribosome Biogenesis through the Zinc Transcriptional Regulatory Element. **Mol Cell Biol**, v. 35, n. 6, p. 977-87, Mar 2015. ISSN 0270-7306 (Print) 1098-5549 (Electronic).

OMATU, T. [Overexpression of human homeobox gene in lung cancer A549 cells results in enhanced motile and invasive properties]. **Hokkaido Igaku Zasshi**, v. 74, n. 5, p. 367-76, Sep 1999. ISSN 0367-6102 (Print) 0367-6102 (Linking).

PARK, T. Y. et al. Amelioration of neurodegenerative diseases by cell death-induced cytoplasmic delivery of humanin. **J Control Release**, v. 166, n. 3, p. 307-15, Mar 28 2013. ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking).

PELTIER, J. et al. Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenic mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 12, p. 3415-23, Dec 2006. ISSN 1046-6673 (Print) 1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://jasn.asnjournals.org/content/17/12/3415.full.pdf> >.

PENKOV, D. et al. Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. **Cell Rep**, v. 3, n. 4, p. 1321-33, Apr 25 2013. ISSN 2211-1247 (Electronic).

PERKINS, N. D. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 12, p. 1433-48, Dec 1997. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking).

PIPER, D. E. et al. Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. **Cell**, v. 96, n. 4, p. 587-97, Feb 19 1999. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)80662-5.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)80662-5.pdf) >.

POMERANTZ, M. M. et al. The androgen receptor cistrome is extensively reprogrammed in human prostate tumorigenesis. **Nat Genet**, v. 47, n. 11, p. 1346-51, Nov 2015. ISSN 1546-1718 (Electronic) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4707683/pdf/nihms-724274.pdf> >.

POURQUIE, O. The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 328-30, Jul 18 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

PRASAD, N. et al. A comparative genomic analysis of targets of Hox protein Ultrabithorax amongst distant insect species. **Sci Rep**, v. 6, p. 27885, Jun 14 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906271/pdf/srep27885.pdf> >.

PREGER-BEN NOON, E. et al. Interplay between activin and Hox genes determines the formation of the kidney morphogenetic field. **Development**, v. 136, n. 12, p. 1995-2004, Jun 2009. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking).

PRINCE, F. et al. The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. **Development**, v. 135, n. 9, p. 1669-79, May 2008. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/development/135/9/1669.full.pdf> >.

PUESCHEL, R.; CORAGGIO, F.; MEISTER, P. From single genes to entire genomes: the search for a function of nuclear organization. **Development**, v. 143, n. 6, p. 910-23, Mar 15 2016. ISSN 1477-9129 (Electronic) 0950-1991 (Linking).

QUINLAN, A. R.; HALL, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 841-2, Mar 15 2010. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking).

RAMACHANDRAN, S. et al. Loss of HOXC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 24, n. 1, p. 188-98, Jan 06 2005. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking).

RAMAN, V. et al. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 974-8, Jun 22 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

RAMBALDI, I.; KOVACS, E. N.; FEATHERSTONE, M. S. A proline-rich transcriptional activation domain in murine HOXD-4 (HOX-4.2). **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 3, p. 376-82, Feb 11 1994. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523592/pdf/nar00027-0132.pdf> >.

RATHER, M. I. et al. Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation: implications for cancer therapeutics. **J Biol Chem**, v. 288, n. 1, p. 608-18, Jan 04 2013. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537059/pdf/zbc608.pdf> >.

REN, B. et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. **Science**, v. 290, n. 5500, p. 2306-9, Dec 22 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

RINN, J. L. et al. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. **PLoS Genet**, v. 2, n. 7, p. e119, Jul 2006. ISSN 1553-7404 (Electronic) 1553-7390 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1523235/pdf/pgen.0020119.pdf> >.

RINN, J. L. et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1311-23, Jun 29 2007. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(07\)00659-9.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(07)00659-9.pdf) >.

ROBERTSON, G. et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. **Nat Methods**, v. 4, n. 8, p. 651-7, Aug 2007. ISSN 1548-7091 (Print) 1548-7091 (Linking).

ROBERTSON, L. K. et al. An interactive network of zinc-finger proteins contributes to regionalization of the *Drosophila* embryo and establishes the domains of HOM-C protein function. **Development**, v. 131, n. 12, p. 2781-9, Jun 2004. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/131/12/2781.full.pdf> >.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-40, Jan 1 2010. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/26/1/139.full.pdf> >.

RODLEY, C. D. et al. Global identification of yeast chromosome interactions using Genome conformation capture. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 11, p. 879-86, Nov 2009. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184509001339> >.

RONSHAUGEN, M.; MCGINNIS, N.; MCGINNIS, W. Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 914-7, Feb 21 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

ROSEN, S. D.; LEMJABBAR-ALAOUI, H. Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. **Expert Opin Ther Targets**, v. 14, n. 9, p. 935-49, Sep 2010. ISSN 1744-7631 (Electronic) 1472-8222 (Linking).

RUDDLE, F. H. et al. Evolution of Hox genes. **Annu Rev Genet**, v. 28, p. 423-42, 1994. ISSN 0066-4197 (Print) 0066-4197 (Linking).

SAINAGHI, P. P. et al. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. **J Cell Physiol**, v. 204, n. 1, p. 36-44, Jul 2005. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541 (Linking).

SAINO, M. et al. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. **Oncol Rep**, v. 12, n. 1, p. 47-52, Jul 2004. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335X (Linking).

SALEH, M. et al. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 22, p. 8623-33, Nov 2000. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102167/pdf/mb008623.pdf> >.

SALSI, V.; ZAPPAVIGNA, V. Hoxd13 and Hoxa13 directly control the expression of the EphA7 Ephrin tyrosine kinase receptor in developing limbs. **J Biol Chem**, v. 281, n. 4, p. 1992-9, Jan 27 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/281/4/1992.full.pdf> >.

SCHUGHART, K.; KAPPEN, C.; RUDDLE, F. H. Duplication of large genomic regions during the evolution of vertebrate homeobox genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 18, p. 7067-71, Sep 1989. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

SCHWARTZ, Y. B.; PIRROTTA, V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 1, p. 9-22, Jan 2007. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking).

SCOTT, M. P. Vertebrate homeobox gene nomenclature. **Cell**, v. 71, n. 4, p. 551-3, Nov 13 1992. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.cell.com/>

cell/abstract/0092-8674(92)90588-4?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867492905884%3Fshowall%3Dtrue >.

SERPENTE, P. et al. Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. **Development**, v. 132, n. 3, p. 503-13, Feb 2005. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/132/3/503.full.pdf> >.

SETHAKORN, N.; DULIN, N. O. RGS expression in cancer: oncoming the cancer microarray data. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 33, n. 3, p. 166-71, Jun 2013. ISSN 1532-4281 (Electronic) 1079-9893 (Linking).

SHAH, N. et al. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ERalpha and inducing IL-6 expression. **Cancer Res**, v. 73, n. 17, p. 5449-58, Sep 01 2013. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/73/17/5449.full.pdf> >.

SHAOQIANG, C. et al. Expression of HOXD3 correlates with shorter survival in patients with invasive breast cancer. **Clin Exp Metastasis**, v. 30, n. 2, p. 155-63, Feb 2013. ISSN 1573-7276 (Electronic) 0262-0898 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935821> >.

SHEN, W. et al. HOXB6 protein is bound to CREB-binding protein and represses globin expression in a DNA binding-dependent, PBX interaction-independent process. **J Biol Chem**, v. 279, n. 38, p. 39895-904, Sep 17 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/279/38/39895.full.pdf> >.

SHEN, W. F. et al. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 21, p. 7509-22, Nov 2001. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).

SHOU, S. et al. HOXA13 regulates Aldh1a2 expression in the autopod to facilitate interdigital programmed cell death. **Dev Dyn**, v. 242, n. 6, p. 687-98, Jun 2013. ISSN 1097-0177 (Electronic) 1058-8388 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.23966/abstract> >.

SLATTERY, M. et al. Genome-wide tissue-specific occupancy of the Hox protein Ultrabithorax and Hox cofactor Homothorax in Drosophila. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e14686, Apr 05 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071676/pdf/pone.0014686.pdf> >.

SONG, L.; CRAWFORD, G. E. DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2010, n. 2, p. pdb prot5384, Feb 2010. ISSN 1559-6095 (Electronic) 1559-6095 (Linking).

SORGE, S. et al. The cis-regulatory code of Hox function in Drosophila. **EMBO J**, v. 31, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.179> > <http://emboj.embopress.org/content/embojnl/31/15/3323.full.pdf> >.

SORGE, S. et al. The cis-regulatory code of Hox function in Drosophila. **EMBO J**, v. 31, n. 15, p. 3323-33, Aug 01 2012. ISSN 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://emboj.embopress.org/content/embojnl/31/15/3323.full.pdf> >.

SOSHNIKOVA, N.; DUBOULE, D. Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1320-3, Jun 05 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/324/5932/1320.long> >.

SPLITZ, F. et al. Large scale transgenic and cluster deletion analysis of the HoxD complex separate an ancestral regulatory module from evolutionary innovations. **Genes Dev**, v. 15, n. 17, p. 2209-14, Sep 01 2001. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312772/pdf/X3.pdf> >.

STELLOO, S. et al. Androgen receptor profiling predicts prostate cancer outcome. **EMBO Mol Med**, v. 7, n. 11, p. 1450-64, Nov 2015. ISSN 1757-4676 (Print) 1757-4684 (Electronic).

STOCKINGER, A. et al. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. **J Cell Biol**, v. 154, n. 6, p. 1185-96, Sep 17 2001. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2150811/pdf/0104036.pdf> >.

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v. 22, n. 12, p. 1540-2, Jun 15 2006. ISSN 1367-4803 (Print) 1367-4803 (Linking).

SVINGEN, T.; TONISSEN, K. F. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. **Heredity (Edinb)**, v. 97, n. 2, p. 88-96, Aug 2006. ISSN 0018-067X (Print) 0018-067X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721389> >.

SYM, M.; ROBINSON, N.; KENYON, C. MIG-13 positions migrating cells along the anteroposterior body axis of *C. elegans*. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 25-36, Jul 09 1999. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)80603-0.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)80603-0.pdf) >.

TABUSE, M. et al. Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells. **Mol Cancer**, v. 10, p. 60, 2011. ISSN 1476-4598 (Electronic) 1476-4598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118386/pdf/1476-4598-10-60.pdf> >.

TAGHLI-LAMALLEM, O. et al. Direct interaction between Teashirt and Sex combs reduced proteins, via Tsh's acidic domain, is essential for specifying the identity of the prothorax in *Drosophila*. **Dev Biol**, v. 307, n. 1, p. 142-51, Jul 01 2007. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0012160607008032/1-s2.0-S0012160607008032-main.pdf?_tid=5c336332-6b2c-11e7-8ae8-00000aacb35d&acdnat=1500322573_701a89f7270b2a8208451332790a812e >.

TAGHLI-LAMALLEM, O. et al. Context-dependent regulation of Hox protein functions by CK2 phosphorylation sites. **Dev Genes Evol**, v. 218, n. 6, p. 321-32, Jun 2008. ISSN 0949-944X (Print) 0949-944X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2443945/pdf/nihms55944.pdf> >.

TAIT, D. L. et al. Downregulation of HOXC6 in Serous Ovarian Cancer. **Cancer Invest**, v. 33, n. 7, p. 303-11, 2015. ISSN 1532-4192 (Electronic) 0735-7907 (Linking).

TAKAHASHI, O. et al. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 17, n. 4, p. 753-60, Apr 2007. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.spandidos-publications.com/or/17/4/753/download> >.

TAKAHASHI, Y. et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. **Exp Cell Res**, v. 293, n. 1, p. 144-53, Feb 01 2004. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827 (Linking).

THURMAN, R. E. et al. The accessible chromatin landscape of the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 75-82, Sep 06 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3721348/pdf/nihms377833.pdf> >.

TOUR, E.; HITTINGER, C. T.; MCGINNIS, W. Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the Drosophila Hox protein Ultrabithorax. **Development**, v. 132, n. 23, p. 5271-81, Dec 2005. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/develop/132/23/5271.full.pdf> >.

TSCHOPP, P.; DUBOULE, D. A genetic approach to the transcriptional regulation of Hox gene clusters. **Annu Rev Genet**, v. 45, p. 145-66, 2011. ISSN 1545-2948 (Electronic) 0066-4197 (Linking).

VAN DER HORST, G. et al. Targeting of Alpha-V Integrins Reduces Malignancy of Bladder Carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic).

VIDER, B. Z. et al. Deregulated expression of homeobox-containing genes, HOXB6, B8, C8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 272, n. 2, p. 513-8, Jun 7 2000. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00928043> >.

VOLPE, M. V. et al. Expression of Hoxb-5 during human lung development and in congenital lung malformations. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 67, n. 8, p. 550-6, Aug 2003. ISSN 1542-0752 (Print) 1542-0752 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdra.10086/abstract> >.

WAGNER, E. F.; NEBRED, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537-49, Aug 2009. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking).

WAGNER, K. et al. Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. **Mech Dev**, v. 103, n. 1-2, p. 127-31, May 2001. ISSN 0925-4773 (Print) 0925-4773 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0925477301003495/1-s2.0-S0925477301003495-main.pdf?_tid=50893cd2-6b2c-11e7-97f3-00000aab0f6c&acdnat=1500322553_c281bc97f646fce0e482177cc5d9b418 >.

WALSH, C. A. et al. Global gene repression by the steroid receptor coactivator SRC-1 promotes oncogenesis. **Cancer Res**, v. 74, n. 9, p. 2533-44, May 01 2014. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/74/9/2533.full.pdf> >.

WANG, D. et al. Humanin delays apoptosis in K562 cells by downregulation of P38 MAP kinase. **Apoptosis**, v. 10, n. 5, p. 963-71, Oct 2005. ISSN 1360-8185 (Print) 1360-8185 (Linking). Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10495-005-1191-x> >.

WANG, H. et al. HOXA1 enhances the cell proliferation, invasion and metastasis of prostate cancer cells. **Oncol Rep**, v. 34, n. 3, p. 1203-10, Sep 2015. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <https://www.spandidos-publications.com/or/34/3/1203/download> >.

WANG, J. et al. ArhGAP30 promotes p53 acetylation and function in colorectal cancer. **Nat Commun**, v. 5, p. 4735, Aug 26 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/ncomms5735.pdf> >.

WANG, K. C. et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 120-4, Apr 07 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670758/pdf/nihms-338997.pdf> >.

WANG, L. et al. Aberrant regulation of FBW7 in cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 8, p. 2000-15, Apr 30 2014. ISSN 1949-2553 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039140/pdf/oncotarget-05-2000.pdf> >.

WANG, L. et al. Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy. **Pharmacol Ther**, v. 151, p. 141-51, Jul 2015. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking).

WANG, X. et al. HOXC9 directly regulates distinct sets of genes to coordinate diverse cellular processes during neuronal differentiation. **BMC Genomics**, v. 14, p. 830, Nov 25 2013. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking).

WANG, X. et al. Transmembrane protein MIG-13 links the Wnt signaling and Hox genes to the cell polarity in neuronal migration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 27, p. 11175-80, Jul 02 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703986/pdf/pnas.201301849.pdf> >.

WATSON, P. M. et al. CaSm (LSm-1) Overexpression in Lung Cancer and Mesothelioma Is Required for Transformed Phenotypes. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 38, n. 6, p. 671-8, Jun 2008. ISSN 1044-1549 (Print) 1535-4989 (Electronic).

WEINSTEIN, J. N. et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. **Nat Genet**, v. 45, n. 10, p. 1113-20, Oct 2013. ISSN 1546-1718 (Electronic) 1061-4036 (Linking).

WILLIAMS, T. M.; WILLIAMS, M. E.; INNIS, J. W. Range of HOX/TALE superclass associations and protein domain requirements for HOXA13:MEIS interaction. **Dev Biol**, v. 277, n. 2, p. 457-71, Jan 15 2005. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0012160604007195/1-s2.0-S0012160604007195-main.pdf?_t_i_d=704a3ac2-49f7-11e7-a0d2-00000aab0f26&acdnat=1496671454_a308e93e298a78656c38cca36c47ebe7 >.

WU, C. et al. The chromatin structure of specific genes: I. Evidence for higher order domains of defined DNA sequence. **Cell**, v. 16, n. 4, p. 797-806, Apr 1979. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

WU, G. et al. Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 3, p. e2700, Mar 23 2017. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386520/pdf/cddis2017113a.pdf> >.

WU, X. et al. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Res**, v. 66, n. 19, p. 9527-34, Oct 1 2006. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018609> >.

WU, Y. et al. HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 16, p. 5680-91, Aug 2003. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).

XIA, B. et al. Homeobox A11 hypermethylation indicates unfavorable prognosis in breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 6, p. 9794-9805, Feb 07 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking).

XIE, T. X. et al. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. **Oncol Rep**, v. 23, n. 3, p. 725-32, Mar

2010. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <https://www.spandidos-publications.com/or/23/3/725/download> >.

XUE, M. et al. HoxB9 promotes the migration and invasion via TGF-beta1/Smad2/Slug signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. **Am J Transl Res**, v. 9, n. 3, p. 1151-1161, 2017.

YAMANE, K. et al. Regulation of SLD5 gene expression by miR-370 during acute growth of cancer cells. **Sci Rep**, v. 6, 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic).

YAMASHITA, T. et al. Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. **Int J Oncol**, v. 28, n. 4, p. 931-8, Apr 2006. ISSN 1019-6439 (Print) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <https://www.spandidos-publications.com/ijo/28/4/931/download> >.

YAN, J. et al. Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. **Cell**, v. 154, n. 4, p. 801-13, Aug 15 2013. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0092867413009422/1-s2.0-S0092867413009422-main.pdf?_tid=81347ac8-63d4-11e6-a5bb-00000aabb0f26&acdnat=1471367683_8ab43c66a27e1e27287338de06a44e16 >.

YANG, Y. et al. Databases and Web Tools for Cancer Genomics Study. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 46-50, Feb 2015. ISSN 1672-0229 (Print) 2210-3244 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411507/pdf/main.pdf> >.

YANO, K. et al. Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. **Br J Dermatol**, v. 152, n. 1, p. 115-21, Jan 2005. ISSN 0007-0963 (Print) 0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2005.06368.x/abstract> >.

YATES, A. et al. Ensembl 2016. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. Database issue, p. D710-6, Jan 4 2016. ISSN 0305-1048 (Print) 1362-4962 (Electronic).

YOSHIDA, H. et al. Dereglulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Res**, v. 66, n. 2, p. 889-97, Jan 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/66/2/889.full.pdf> >.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. **OMICS**, v. 16, n. 5, p. 284-7, May 2012. ISSN 1557-8100 (Electronic) 1536-2310 (Linking).

ZACCOLO, M.; MOVSESIAN, M. A. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. **Circ Res**, v. 100, n. 11, p. 1569-78, Jun 08 2007. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org/content/circresaha/100/11/1569.full.pdf> >.

ZAKANY, J. et al. Deletion of a HoxD enhancer induces transcriptional heterochrony leading to transposition of the sacrum. **EMBO J**, v. 16, n. 14, p. 4393-402, Jul 16 1997. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking).

ZHANG, H.; ZHAO, J. H.; SUO, Z. M. Knockdown of HOXA5 inhibits the tumorigenesis in esophageal squamous cell cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 86, p. 149-154, Feb 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking).

ZHANG, J. et al. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 2, p. 949-56, Feb 2013. ISSN 1573-4978 (Electronic) 0301-4851 (Linking). Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11033-012-2136-4> >.

ZHANG, M. L. et al. HOXA5 indicates poor prognosis and suppresses cell proliferation by regulating p21 expression in non small cell lung cancer. **Tumour Biol**, v. 36, n. 5, p. 3521-31, May 2015. ISSN 1423-0380 (Electronic) 1010-4283 (Linking). Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13277-014-2988-4> >.

ZHANG, Q. et al. Upregulated Hoxc6 expression is associated with poor survival in gastric cancer patients. **Neoplasma**, v. 60, n. 4, p. 439-45, 2013. ISSN 0028-2685 (Print) 0028-2685 (Linking).

ZHANG, R. et al. miR-337 regulates the proliferation and invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting HOXB7. **Diagn Pathol**, v. 9, p. 171, Sep 03 2014. ISSN 1746-1596 (Electronic) 1746-1596 (Linking).

ZHANG, X. et al. HOXC6 and HOXC11 increase transcription of S100beta gene in BrdU-induced in vitro differentiation of GOTO neuroblastoma cells into Schwannian cells. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 2, p. 299-306, Mar-Apr 2007. ISSN 1582-1838 (Print) 1582-1838 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822828/pdf/jcmm0011-0299.pdf> >.

ZHANG, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome Biol**, v. 9, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137> http://download.springer.com/static/pdf/341/art%253A10.1186%252Fgb-2008-9-9-r137.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fgenomebiology.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fgb-2008-9-9-r137&token2=exp=1496759676~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F341%2Fart%25253A10.1186%25252Fgb-2008-9-9-r137.pdf*~hmac=a5ab66455060d46557d3c1bc60f3396dfc72ba0bcc2deac25343f8e42a06c7fb >.

ZHAO, J. J.; LAZZARINI, R. A.; PICK, L. Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. **EMBO J**, v. 15, n. 6, p. 1313-22, Mar 15 1996. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC450034/pdf/emboj00006-0113.pdf> >.

ZHAO, P. et al. Aberrant Expression of HOXA5 and HOXA9 in AML. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 9, p. 3941-4, 2015. ISSN 2476-762X (Electronic) 1513-7368 (Linking).

ZHENG, G. et al. ITFP: an integrated platform of mammalian transcription factors. **Bioinformatics**, v. 24, n. 20, p. 2416-7, Oct 15 2008. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking).

ZHONG, Z. B. et al. Prognostic significance of HOXD13 expression in human breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 9, p. 11407-13, 2015. ISSN 1936-2625 (Electronic) 1936-2625 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637683/pdf/ijcep0008-11407.pdf> >.