THAÍS ACQUAFREDA ANTUNES

**LOCALIZAÇÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE *PMX1* EM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA ATRAVÉS DA TÉCNICA
DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU**

São Paulo

2005

Thaís Acquafreda Antunes

**Localização dos transcritos do gene *PMX1* em carcinomas
epidermóides de boca através da técnica de hibridização in situ**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Antunes TA. Localização dos transcritos do gene *PMX1* em carcinomas epidermóides de boca através da técnica de hibridização in situ [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, 23/01/2006.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe, Maria Cecília, a pessoa mais importante da minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me ajudando e me incentivando a alcançar os meus objetivos. Você é o meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes** pelos conhecimentos transmitidos e disponibilidade para orientação desde os tempos de Iniciação Científica.

À **Profa Dra Vera Cavalcanti de Araújo** e ao **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo** pela oportunidade de estar próxima dos dois exemplos de competência e sabedoria a serem seguidos na pesquisa.

À todos os professores da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, **Profa Dra Suzana C. Orsini Machado de Sousa**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, **Profa Dra Marina Helena C. G. de Magalhães**, **Profa Dra Marília Trierveiler Martins**, **Profa Dra Andréa Mantesso** e **Profa Dra Karem Lopes Ortega** pelo convívio, disponibilidade e integração com os alunos de pós-graduação.

À Dra. **Maria das Graças da Silva-Valenzuela**, pessoa fundamental para a execução desse projeto, pelos ensinamentos, pela convivência e pela amizade.

À **Luciana Matizonkas** e **Tatiana Libório** pela amizade, pelo apoio e pela disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Molecular **Márcia**, **Camila**, **Vanessa**, **Nívea**, **Ricardo**, **Lineu**, pela amizade, por toda ajuda prestada e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos da Patologia Bucal com os quais tive o prazer de conviver **Michelly Peruzetto, Karen Hiraki, Sérgio, Juliana Kimura, Carol, Fabrício Passador, Arlindo Aburad, Felipe Torquato, Filipe Modolo, Katiuchia Uzzun, Alexandre Fraige, Natalie Pepe, Patrícia, Alexander, Adriano, Renata, Alexandra** pela amizade e convivência harmoniosa.

À todas as funcionárias da disciplina de patologia bucal **Zilda, Néia, Nair, Patrícia, Edna, Elisa e Bia** pelo convívio e pela presteza sempre que foi preciso.

Ao **Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa para cursar a Pós-Graduação em Patologia Bucal.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento do projeto referente ao estudo de genes homeobox do nosso laboratório, do qual esse trabalho faz parte.

Aos integrantes da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da FMUSP, representados pelo **Prof Dr. Alberto Ferraz**, pela parceria e concessão das amostras de tecidos utilizados nesse projeto.

Ao meu namorado, **André**, pelo amor, carinho e paciência para tentar aprender e entender sobre o que se trata esse trabalho.

Ao amigo **Paulo Braz**, pela amizade desde a Graduação, pelas conversas, idéias e toda ajuda prestada.

Aos amigos, **Patrícia Mazzola, Maria Cláudia, Vanessa Ormeni, Ilka, Livia, Lúdia, Renata Cristiane, Mariana Minatel, Flávia Chammas, Juliano, Paulinha,** pela amizade e por todo o apoio e confiança.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no curso de Mestrado da FOU SP .

A Ignorância

“O povo julga bem as coisas, porque está na ignorância natural, que é o verdadeiro lugar do homem. A ciência tem duas extremidades que se tocam. A primeira é a pura ignorância natural, na qual se encontram todos os homens ao nascer. A outra extremidade é aquela a que chegam as grandes almas que, tendo percorrido tudo quanto os homens podem saber, acham que nada sabem e voltam a encontrar-se nessa mesma ignorância da qual tinham partido; mas é uma ignorância sábia que se conhece. Os do meio, que saíram dessa ignorância natural e não puderam chegar à outra, têm umas pinceladas dessa ciência suficiente, e armam-se em entendidos. Esses perturbam o mundo e julgam mal de tudo. O povo e os verdadeiramente sábios compõem a ordem do mundo.”

Blaise Pascal, em “Pensamentos”

Antunes TA. Localização dos transcritos do gene *PMX1* em carcinomas epidermóides de boca através da técnica de hibridização in situ [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Câncer e desenvolvimento embrionário possuem diversos aspectos em comum, pois ambos exibem alternância entre proliferação e diferenciação celular. A família dos genes homeobox codifica fatores de transcrição fundamentais para o adequado desenvolvimento embrionário, e têm sido descritos em diferentes neoplasias. O *PMX1* (Paired Mesoderm Homeobox 1) é um gene homeobox que está expresso durante o desenvolvimento de diversos tecidos mesenquimais, como o sistema cardiovascular e elementos do esqueleto. A relação entre o *PMX1* e neoplasias malignas ainda não está bem estabelecida. O objetivo desse trabalho foi verificar a presença dos transcritos do gene *PMX1* em carcinomas epidermóides de boca e tecidos não tumorais adjacentes. Foi realizada hibridização in situ com sondas marcadas com digoxigenina em dezesseis amostras de carcinoma epidermóide de boca e dez de tecido não tumoral adjacente. No tecido não tumoral adjacente o sinal de hibridização é mais intenso nas camadas basal e suprabasal, mesmo quando ele pode ser observado em outras camadas. No carcinoma epidermóide de boca, o sinal está disperso por todo o tecido sendo mais intenso em áreas com células isoladas. Nossos resultados mostram a presença dos transcritos do *PMX1* em epitélio de boca e em carcinoma epidermóide de boca e sugerem a participação do gene *PMX1* na carcinogênese de boca. A sua expressão em neoplasias pouco diferenciadas deve ser melhor analisada.

Palavras-Chave: Genes Homeobox – *PMX1*; carcinoma epidermóide de boca; Híbridização in situ

Antunes TA. Localization of *PMX1* transcripts in oral squamous cell carcinoma by in situ hybridization [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

Cancer and development share common features since both processes exhibit shifts between cell proliferation and differentiation. Homeobox gene family encodes transcription factors essentials for appropriate embryonic development and they have been described in different types of neoplastic tissues. *PMX1* (Paired Mesoderm Homeobox 1) is homeobox gene that has been related with mesenchyma throughout development such cardiovascular system and skeletal elements, however its relation with tumor development is not well established yet. The purpose of this study was to verify the presence of *PMX1* transcripts in oral squamous cell carcinomas and adjacent non-tumoral tissues. In situ hybridization was performed with probes labeled with digoxigenin in sixteen samples of squamous cell carcinoma and ten o adjacent non-tumoral tissues. In the adjacent non-tumoral tissues in situ hybridization signaling detected were more intense in the basal and parabasal layers even when it could be observed in other layers. In the oral squamous cell carcinoma the signaling was spread all over the tissue becoming more intense in areas with isolated carcinoma cells. Our findings show *PMX1* transcripts in adjacent non-tumoral tissues and oral squamous cell carcinoma and suggest participation of *PMX1* in oral carcinogenesis. Its expression in poorly differentiated carcinomas needs to be analyzed in detail.

Keywords: Homeobox genes – *PMX1*; Squamous cell carcinoma; In situ hybridization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 - Transformações homeóticas na *Drosophila melanogaster*. (A) *Drosophila* normal, (B) mutação no gene Bithorax que leva a formação de um par de asas a mais e (C) com mutação no gene Antennapedia exibindo uma pata no lugar da antena (GRIER et al., 2005) 30
- Figura 2.2 - Estrutura do homeodomínio mostrando a interação entre a terceira hélice e o sulco maior do DNA (ABATE-SHEN, 2002) 32
- Figura 2.3 - Algumas classes de homeoproteínas que possuem domínios adicionais (ABATE-SHEN, 2002) 32
- Figura 2.4 - Na parte superior temos os genes Hox da *Drosophila* (HOM-C) que estão alinhados com os seus homólogos em humanos (HOX A, B, C e D) e suas respectivas posições cromossômicas (GRIER et al., 2005) ...33
- Figura 2.5 - Esquema das modificações pós traducionais de homeoproteínas. M: modificações pós traducionais; GTF: fator de transcrição geral, do inglês “general transcription factor” (ABATE-SHEN, 2002) 34
- Figura 2.6 - Genes Homeobox e os seus alvos no ciclo celular. As linhas azuis indicam ativação ou repressão direta, as linhas vermelhas mostram interação proteína-proteína, as linhas verdes mostram ativação ou repressão indireta e as linhas pretas indicam interações que ainda não se mostraram como diretas (DEL BENE; WITTBRODT, 2005) 35
- Figura 4.1 - Cromatograma de uma região do gene *PMX1* obtido após o sequenciamento do produto amplificado por RT-PCR.....53
- Figura 4.2 - Gel de agarose a 1% mostrando o DNA plasmídeo e o DNA linearizado. PP= padrão de pares de base; PI=DNA plasmídeo; L1=linearização com enzima EcoR5; L2=linearização com enzima BamH1 55
- Figura 4.3 - Gel de agarose a 1% mostrando o produto de transcrição com RNA polimerases T7 (S1 e S3) e SP6 (S2 e S4). 56

Figura 5.1 - Localização de transcritos do gene *PMX1* em tecidos não tumorais adjacentes. (A) HE de mucosa de soalho e (B) ISH em corte pareado de (A) exibindo sinal de hibridização nas camadas basal e suprabasal (25X). (C) HE de soalho de boca e (D) corte pareado de (C) com sinal de hibridização disperso por todas as camadas do epitélio (100X). (E) HE de mucosa de língua e (F) corte pareado de exibindo sinal de hibridização em todas as camadas do epitélio, porém a intensidade do sinal é variável nas diversas células (25X). (G) Tecido hibridizado com sonda senso não exibindo sinal de hibridização (25X). (H) Padrão de marcação exibindo sinal de hibridização apenas no citoplasma celular (200X).....61

Figura 5.2 - Localização dos transcritos do gene *PMX1* no carcinoma epidermóide de boca. (A) HE de carcinoma epidermóide de língua e (B) ISH em corte pareado de (A) em área pouco diferenciada exibindo sinal de hibridização muito intenso em células isoladas (100X). (C) HE de carcinoma epidermóide em área de maxila e (D) corte pareado de (C) com área moderadamente diferenciada evidenciando sinal de hibridização intenso (100X). (E) HE de carcinoma epidermóide em rebordo alveolar e (F) corte pareado de (E) com sinal de hibridização fraco em área de carcinoma epidermóide bem diferenciado, embora algumas células ao redor de pérolas de queratina apresentem sinal mais intenso (25X). (G) HE de carcinoma epidermóide em língua e (H) corte pareado de (G) exibindo sinal de hibridização mais intenso nas células do fronte de invasão (25X). 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Dados referentes ao gene PMX1, iniciadores utilizados, e tamanho do produto 50

Tabela 4.2 - Volumes e concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR.51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
°C	graus Celsius
aa	aminoácidos
AJCC	do inglês “American Joint Committee on Cancer”
BLAST	do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”, programas de busca por similaridade de seqüências em bancos de dados
bFGF	do inglês “basic fibroblast growth factor”
bZip	do inglês “basic-leucine zipper”
CDK4	do inglês “cyclin dependent kinases 4”
cDNA	do inglês “complementary desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico complementar
CE	carcinoma epidermóide
DEPC	dietilpirocarbonato
Dhh	do inglês “Desert hedgehog”
DNA	do inglês “desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
DTT	ditiotreitól
E8.0 e E14,5	estágio 8.0 e 14.5 do desenvolvimento embrionário

EBV	do inglês “Epstein_Barr vírus”
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	do inglês “epithelial growth factor receptor” ou receptor do fator de crescimento epitelial
EMX2	do inglês “empty spiracles”
FGF	do inglês “fibroblast growth factor” ou fator de crescimento fibroblástico
HE	coloração por hematoxilina-eosina
HOM-C	complexo homeótico da <i>Drosophila melanogaster</i>
HOX	genes HOX (homeobox agrupados)
HPV	do inglês “human papillomavirus”
Ihh	do inglês “Indian hedgehog”
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISH	do inglês “ <i>in situ</i> hybridization”, reação de hibridização <i>in situ</i>
kb	kilobases, corresponde a 1000 pb
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
mRNA	do inglês “messenger ribonucleid acid” ou ácido ribonucléico mensageiro
MSX	do inglês “muscle segment homeobox
NCBI	do inglês “National Center for Biotechnology Information”
ng	nanograma

OMS	Organização Mundial de Saúde
OTX	do inglês “orthodenticle”
PAX	do inglês “paired box gene”
pb	pares de base
PCR	do inglês “polimerase chain reaction”, técnica da reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
PIT	do inglês “paired-like homeodomain transcription factor”
PITX	do inglês “paired-like homeobox”
PMX	do inglês “paired mesoderm homeobox”
pRb	proteína do Retinoblastoma
PTEN	do inglês “phosphatase and tensin homolog”
RNA	do inglês “ribonucleid acid” ou ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	do Inglês “reverse transcriptase polimerase chain reaction”, técnica da reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa
SRE	do inglês “serum response element”
SFR	do inglês “serum response factor”
SIX	do inglês “sine oculis homeobox”
Shh	do inglês “Sonic hedgehog”
TA	temperatura ambiente
TAE	tris-acetato EDTA

TGF-α	do inglês “transforming growth factor alpha” ou fator de crescimento transformante alfa
TN-C	do inglês, “tenascin-C” ou tenascina-C
TNM	estadiamento TNM em que T= tumor; N= acometimento de linfonodos e M= metástases à distância
UICC	do Francês “Union Internationale Contre Le Cancer”
UVB	raios ultra-violetas B
Wnt	família de genes homólogos ao gene Wg (wingless) da <i>Drosophila melanogaster</i> , da contração em inglês “Wg + int”

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Câncer de boca.....	21
2.1.1 epidemiologia.....	22
2.1.2 etiologia	23
2.1.3 bases moleculares	24
2.1.4 fatores prognósticos	27
2.2 Câncer e Desenvolvimento Embrionário	28
2.3 Os Genes Homeobox	29
2.3.1 os genes homeobox e câncer	35
2.4 O Gene PMX1	38
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
5 RESULTADOS	59
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o desenvolvimento embrionário e a oncogênese possuem muitos aspectos em comum. Tendo em vista essa premissa, diversos estudos de biologia molecular foram realizados para demonstrar a relação entre os genes que controlam importantes aspectos do desenvolvimento e as diversas neoplasias malignas. Muitos desses estudos demonstraram uma relação entre os genes homeobox e a oncogênese.

O projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço” verificou produtos da transcrição de diversos genes em diferentes neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço. Entre esses genes, foram encontrados aproximadamente vinte homeobox, sendo um deles o *PMX1* (Paired Mesoderm Homeobox 1).

O gene *PMX1* pertence a família dos genes homeobox, que são conhecidos por serem controladores do desenvolvimento embrionário, e regula aspectos essenciais da embriogênese, morfogênese e diferenciação celular. A sua presença já foi verificada em diversos tecidos mesênquimais durante o desenvolvimento, como o sistema cardiovascular, respiratório e elementos do esqueleto, no entanto a sua relação com o desenvolvimento de neoplasias malignas não está bem estabelecida.

Considerando que o projeto genoma câncer não permitiu verificar se transcritos dos genes homeobox estavam presentes no carcinoma epidermóide de boca, e sendo essa a neoplasia maligna mais a freqüente entre as que acometem a cavidade bucal, propusemo-nos a verificar se transcritos do gene *PMX1* eram amplificáveis nessa neoplasia, e se as células neoplásicas os exibiam utilizando a técnica da hibridização *in situ*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de boca

Entre as neoplasias malignas que afetam a cavidade bucal, o carcinoma epidermóide (CE) é responsável por 95% do total de casos. Os outros 5% são representados por melanomas, sarcomas e neoplasias de glândulas salivares (BRASIL, 2002).

O CE é uma neoplasia maligna epitelial que tem a sua origem em células próximas a camada basal que, devido a agentes etiológicos diversos, passaram a ter uma capacidade de expansão anormal e acabam por substituir o epitélio normal (NAGPAL; DAS, 2003).

Pacientes do sexo masculino, acima dos 50 anos de idade, são os mais acometidos por essa doença. As lesões podem ser tanto endofíticas quanto exofíticas, no entanto a primeira forma é mais comum, apresentando uma área central irregular e ulcerada, com bordos mais elevados. Leucoplasias, eritropias e leucoeritropias são lesões que devem ser atentamente observadas, pois em muitos casos podem já se tratar de displasia severa, carcinoma in situ ou superficialmente invasivo (NEVILLE et al., 1998).

Os sítios mais afetados pelo CE são lábio, língua e assoalho da boca, podendo também afetar trígono retro-molar, mucosa jugal, rebordo alveolar e palato duro. Essa doença pode levar a destruição do osso subjacente levando a uma radiotransparência com margens indefinidas Apesar dessas lesões se localizarem

em áreas de fácil acesso ao exame, a maioria delas possui diagnóstico tardio devido à ausência de dor (NEVILLE et al, 1998).

2.1.1 epidemiologia

De acordo com dados da OMS, as neoplasias malignas de boca ocupam a oitava posição entre as mais freqüentes no mundo, no entanto a sua incidência é extremamente variável. Em alguns países da Ásia hábitos locais, como mascar folhas de bétule e tabaco, fazem com que a taxa de incidência de câncer de boca seja muito superior em outras áreas do mundo. Na Índia, por exemplo, a taxa de incidência de câncer de boca para cada 100.000 habitantes é de 12,6, número superior à média mundial que varia entre 1 e 10 (WORLD HEALTH REPORT, 2003).

No Brasil, o INCA estima que em 2005 tenhamos 9985 novos casos de neoplasias malignas de boca entre os homens e 3895 entre as mulheres. Esses números colocam o câncer de boca como o sexto mais freqüente entre os homens e o oitavo entre as mulheres (BRASIL, 2004). Nos Estados Unidos, são esperados, para esse mesmo ano, 29370 novos casos de câncer de boca com 19100 casos entre os homens e 10270 entre as mulheres (JEMAL et al., 2005).

A taxa de mortalidade para neoplasias malignas de boca, no período de 1979 a 1998, variou de 2,16 para 2,96 a cada 100.000 homens e de 0,48 para 0,70 a cada 100.000 mulheres no Brasil (BRASIL, 2002). Nos Estados Unidos, são estimados para 2005, 5190 mortes devido a neoplasias malignas de boca, sendo 3420 entre os homens e 1770 entre as mulheres (JEMAL et al., 2005).

Com relação à sobrevida, os pacientes atendidos no Hospital Erasto Gaertner – Curitiba, no período de 1990 a 1992, apresentaram uma taxa de sobrevida de 50,1% em 5 anos (BRASIL, 2002), já nos Estados Unidos, no período entre 1995 e 2000, a taxa foi de 59% apresentando um aumento de 4 pontos percentuais desde a década de 70 (JEMAL et al., 2005).

2.1.2 etiologia

A etiologia do carcinoma epidermóide de boca ainda não está completamente estabelecida. Acredita-se que não seja apenas um agente específico o responsável pela formação dessa neoplasia, mas sim uma associação de diversos fatores (NEVILLE et al., 1998).

A utilização de tabaco é um dos principais fatores etiológicos. Entre as 2500 diferentes substâncias presentes em sua composição, 300 são consideradas carcinógenos. Entre os principais carcinógenos presentes no tabaco, podemos citar as nitrosaminas específicas do tabaco e os hidrocarbonetos policíclicos. Essas substâncias são metabolizadas e dão origem a compostos hidrofílicos reativos capazes de produzirem danos ao DNA das células (JOHNSON, 2001; DAS; NAGPAL, 2002; KUPER; ADAMI; BOFFETTA; 2002).

A freqüente ingestão de bebidas alcoólicas também é um fator etiológico importante, no entanto não há um consenso sobre a sua ação. Acredita-se que o álcool leve a deficiências nutricionais e imunológicas que permitam que o organismo seja mais suscetível à ação de carcinógenos, assim como aumente a

permeabilidade das células aos carcinógenos presentes, principalmente, no tabaco (DAS; NAGPAL, 2002). Alguns estudos mostraram que o etanol é transformado em acetaldeído por bactérias da flora bucal e essa substância é capaz de promover danos ao DNA das células (HOMANN et al., 1997).

O sinergismo entre tabaco e álcool aumenta muito o risco de desenvolver uma neoplasia maligna de boca. Alguns estudos mostram que a associação entre essas duas substâncias aumenta em 50 vezes a chance de ter um câncer de boca, enquanto o tabaco isolado é responsável por um aumento de 20 vezes, e o álcool 5 vezes (HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005).

A participação de vírus durante a patogênese do carcinoma epidermóide de boca ainda é incerta. Alguns estudos mostram que o HPV e o EBV podem ser encontrados de 10 a 30% dos casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HERMANN et al., 2004).

No caso de lesões que afetam o lábio, a etiologia é diferente das demais lesões intra-orais, sendo a exposição aos raios ultra-violeta o principal fator etiológico (NEVILLE et al., 1998).

2.1.3 bases moleculares

O câncer é considerado uma doença genética que resulta de um acúmulo de alterações no DNA levando a formação de uma célula com capacidade de proliferação e crescimento autônomos. Atualmente, o diagnóstico das neoplasias malignas, que guiará as decisões terapêuticas, é realizado com base na morfologia

da lesão, no entanto, sabe-se que tumores com características morfológicas semelhantes não apresentam, necessariamente, o mesmo curso clínico e resposta terapêutica. Essas diferenças encontradas levam a necessidade de uma nova classificação das neoplasias, com base nas características moleculares da lesão, na tentativa de realizarmos um diagnóstico mais preciso, melhorando o tratamento e prognóstico do paciente (KIM; CALIFANO, 2004; BACKVALL et al., 2005; FELSHER, 2004, CUPERLOVIC-CULF; BELACEL; OUELLETTE, 2005).

As alterações genéticas que levam a formação de neoplasias malignas alteram ao menos quatro categorias de genes. A primeira delas é a dos proto-oncogenes, cujos produtos são importantes para o crescimento celular normal e a sua expressão aumentada ou mutação podem levar ao crescimento celular descontrolado e oncogênese, sendo nesse caso chamados de oncogenes. Os genes supressores de tumor estão relacionados ao controle da divisão celular e caso detectem alguma alteração durante o processo, promovem a parada da divisão. Uma outra categoria de genes que pode estar alterada é a dos genes regulares da apoptose. Eles são necessários para levar à morte celular quando algum erro genético não foi reparado. A quarta categoria de genes que pode estar alterada é a dos genes de reparo do DNA. A alteração nessa família de genes predispõe a novas mutações afetando a proliferação e sobrevivência celular de forma indireta, pois influencia a habilidade do organismo em reparar danos não letais ocorridos em proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores de apoptose (DAS; NAGPAL, 2002; KUMAR; COTRAN; ROBBINS, 2003).

Para o CE de boca ainda não há um perfil molecular definido, devido a sua patogênese complexa e a conhecida necessidade de desestabilização de diversos sistemas de controle celular para que tenhamos a neoplasia (SCHLIEPHAKE, 2003).

Entre os oncogenes associados ao desenvolvimento do CE de boca, podemos destacar a atuação do EGFR que apresenta seu mRNA aumentado 69 vezes em 92% das neoplasias malignas e do TGF- α que tem um aumento de 5 vezes em 87,5% em comparação com tecido normal de pacientes que não têm a neoplasia. Foi observado, que taxas elevadas desses dois oncogenes estão relacionadas a uma redução do tempo livre de doença (GRANDIS; TWEARDY, 1993; RUBIN GRANDIS et al., 1998). A amplificação dos genes da família ras (K-ras, H-ras e N-ras) está associada a pacientes que têm CE de boca relacionado ao hábito de marcar folhas de tabaco. Os genes c-myc e N-myc apresentam superexpressão em 20 a 40% dos casos (DAS; NAGPAL, 2002). Tanto a ciclina D1 quanto a ciclina E apresentam-se expressas na neoplasia em, respectivamente, 35,9% e 62,8% dos casos (SHINTANI et al., 2002).

O gene *P53* é considerado um dos mais importantes genes supressores de tumor. Para o CE de boca, trabalhos mostraram que esse gene apresenta mutações em mais de metade das lesões e a perda de heterozigose ocorre em 20% dos casos. É importante ressaltar que a inativação desse gene está associada a um aumento de recorrências, baixo prognóstico e taxas de sobrevida (DAS; NAGPAL, 2002; LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2002). O gene *p16*, através da sua proteína CDKN2A é responsável pela parada do ciclo celular e apresenta-se inativo em 83% das lesões devido a mutações (REED et al., 1996). O supressor de tumor *PTEN* também está envolvido com o desenvolvimento do CE de boca, sendo que lesões mais agressivas não apresentam essa proteína (SQUARIZE; CASTILHO; SANTOS PINTO JR, 2002).

Diversas alterações genômicas também já foram descritas para o CE de boca. Foi observada uma correlação significativa entre o ganho de 3q25-27 e perda

de 22q com a redução da taxa de sobrevida. O ganho de 17 e 20q, deleção de 19p e 22q e amplificação de 11q13 estão associados à redução da taxa de sobrevida livre de doença (ASHMAN et al., 2003).

2.1.4 fatores prognósticos

A análise de fatores prognósticos é de extrema importância para nortear o planejamento terapêutico do paciente. Atualmente dois sistemas internacionais de classificação, o da AJCC - American Joint Committee on Cancer e o da UICC - Union Internationale Contre le Câncer, são parâmetros empregados para descrição de casos, avaliação prognóstica e formulação de tratamento (YUEN et al., 2000).

Esses dois sistemas de classificação se baseiam em três importantes características, com o intuito de padronizar a descrição da lesão, sendo elas: tamanho do tumor (T), presença e extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e presença ou ausência de metástase à distância (M). De acordo com a gravidade de cada um dos itens da classificação, números são adicionados e esses aspectos reunidos nos auxiliam a definir o estágio clínico da doença, que é fundamental para a tentativa de prever o prognóstico do paciente e definir seu tratamento (UICC, 2004; AJCC, 2004; NEVILLE et al., 1998).

Devido à facilidade de uso, esses dois sistemas de classificação são os mais empregados pelos profissionais, no entanto já se sabe que eles possuem falhas, por deixarem de fora características como grau de diferenciação do tumor, espessura e volume. Yuen et al. (2000) avaliaram lesões de 85 pacientes diagnosticados com CE

de língua, comparando largura, espessura, área, comprimento, diâmetro e volume dos tumores com as características clínicas dos pacientes. Eles observaram que de todos os parâmetros analisados, a espessura foi o único que se mostrou significativo com relação à sobrevida, metástase linfonodal e recorrência local.

2.2 Câncer e Desenvolvimento Embrionário

Muito se tem estudado sobre as alterações moleculares que levam a formação das diferentes neoplasias malignas. Tais estudos mostraram que o câncer é o resultado de uma desregulação dos genes que controlam o crescimento, a diferenciação e a morte celular. Essas informações levaram os pesquisadores a relacionar o desenvolvimento embrionário e o câncer, pois ambos os processos são resultado da alternância entre proliferação e diferenciação celular (FORD, 1998).

Uma importante ligação entre câncer e desenvolvimento é a família de genes Hedgehog. Esse grupo é formado, em mamíferos, por três genes, o *Shh*, o *Ihh* e o *Dhh*, que são essenciais para modelar a formação de diversos tecidos e cuja redução está relacionada com a má formação de diversas estruturas (TAIPALE; BEACHY, 2001). Observou-se que a mutação da proteína Patched, que é o receptor de membrana das proteínas da família Hedgehog, está fortemente associada à síndrome do carcinoma nevóide basocelular, na qual há a formação de diversos carcinomas basocelulares (GAILANI; BALE, 1997).

Os genes *Wnt* são também importantes no desenvolvimento embrionário e o câncer. São responsáveis por codificar a formação de glicoproteínas que participam

da proliferação e diferenciação celular, e que são fatores multipotentes capazes de induzir diversas respostas biológicas em diferentes células ou tecidos (NUSSE; VARMUS, 1992). Esses genes estão presentes no embrião e no tecido adulto de muitas espécies, onde eles atuam na transdução de sinais durante o desenvolvimento e a diferenciação celular (PLEASURE, 2001; YAMAGUCHI et al., 1999). Eles têm sido relacionados com o desenvolvimento de lesões malignas (POLAKIS, 2000; BARKER; CLEVERS, 2000) e isso pode ser comprovado pelo fato de encontrarmos os genes *Wnt* 1, 2, 3A, 4, 5A e 7B diferentemente expressos quando comparamos tecido normal da mama com lesões benignas ou malignas deste tecido (HUGUET et al., 1995; BUI et al., 1997).

Os genes homeobox são conhecidos como genes controladores do desenvolvimento e da evolução (do inglês “master control genes”), pois se encontram no topo de hierarquias genéticas controlando morfogênese e diferenciação celular em animais (MARK; RIJLI; CHAMBOM, 1997). Assim como os demais genes de desenvolvimento embrionário, os homeobox também foram implicados na carcinogênese. Observou-se expressão alterada de diversos genes homeobox durante a progressão de diferentes tipos de neoplasias malignas, entre elas podemos citar as de pele, próstata, mama, ovário, cólon e as leucemias, (CILLO et al., 1999, 2001; ABATE-SHEN, 2002; NUNES et al., 2003).

2.3 Os Genes Homeobox

Desde a observação inicial de mutações na *Drosophila melanogaster* por Thomas Hunt Morgan em 1910, esse inseto tornou-se um dos mais estudados com o objetivo de entender os mecanismos de embriogênese e desenvolvimento em seres vivos (MARK; RIJLI; CHAMBOM, 1997).

O termo “homeo” vem do grego e significa similar, parecido. Ele foi inicialmente empregado para nomear um grupo de genes da *Drosophila*, os genes do complexo homeótico (HOM-C), que eram capazes de causar o fenômeno chamado homeose quando mutados. Esse fenômeno consiste na transformação de uma estrutura do corpo em outra perfeitamente igual. Como exemplo, podemos citar a formação de patas onde deveriam existir antenas, quando há mutação no gene Antennapedia (Figura 2.1). Posteriormente, foi demonstrado que os homeobox estão presentes em todos os metazoários, de esponjas a vertebrados, além de plantas e fungos, e manteve-se conservado em todos os reinos (DE ROBERTIS; OLIVER; WRIGHT, 1990; MARK; RIJLI; CHAMBOM, 1997).

Figura 2.1 – Transformações homeóticas na *Drosophila melanogaster*. (A) *Drosophila* normal, (B) mutação no gene Bithorax que leva a formação de um par de asas a mais e (C) com mutação no gene Antennapedia exibindo uma pata no lugar da antena (GRIER et al., 2005)

Os genes homeobox são assim chamados por possuírem um segmento de DNA característico, o homeodomínio, formado por 180 pares de base que é responsável pela codificação de uma proteína de 60 aminoácidos. O homeodomínio é responsável pela interação com o DNA, permitindo que os homeobox tenham a função de fatores de transcrição. A sua estrutura tridimensional manteve-se

conversada durante a evolução, sendo constituída por três hélices na forma de hélice-alça-hélice (Figura 2.2). As duas primeiras hélices apresentam-se paralelas entre si e cruzando a terceira, que é a responsável pela ligação ao DNA (ABATE-SHEN, 2002; CILLO et al., 2001; BANERJEE-BASU; SINK; BAXEVANIS, 2001).

As homeoproteínas possuem a sua estrutura tridimensional preservada graças a aminoácidos que se mantiveram conservados durante a evolução, no entanto, outros aminoácidos que não são essenciais para estrutura da proteína exibem grande diversidade. Essa diversidade existente dentro do homeodomínio, juntamente com os outros domínios que podem estar presentes nas homeoproteínas, são responsáveis pela formação de diferentes classes de proteínas que terão especificidades distintas ao DNA e, portanto, funções diferentes (Figura 2.3) (ABATE-SHEN, 2002).

Em mamíferos temos mais de 200 genes homeobox, sendo que eles podem ser divididos em duas grandes famílias, a dos homeobox agrupados (HOX) e a dos não agrupados. Os genes *HOX* possuem grande homologia com os genes do complexo HOM-C da *Drosophila* e por isso são também genes homeóticos. Eles são em número de 39 e estão agrupados em quatro grupos A, B, C e D que se localizam, respectivamente, nos cromossomos 7, 17, 12 e 2 e começam a ser expressos durante a gastrulação. A função deles é o controle da identidade celular no eixo antero-posterior do embrião, indo da região dos arcos branquiais à cauda. Esse processo ocorre seguindo uma ordem de colinearidade espacial e temporal, com os genes *HOX* da região 3' sendo expressos primeiramente nas estruturas da região anterior e os da região 5', mais tardiamente, na região posterior (Figura 2.4) (CILLO et al., 1999; VERAкса; DEL CAMPO; MCGINNIS, 2000; DEL BENE ; WITTBRODT, 2005).

Figura 2.2 - Estrutura do homeodomínio mostrando a interação entre a terceira hélice e o sulco maior do DNA (ABATE-SHEN, 2002)

A classe dos homeobox não agrupados é formada por um número de genes superior aos HOX, e tem aumentado com a freqüente descoberta de novos genes. A característica marcante deles é a combinação do homeodomínio com outros domínios, o que dá origem a subfamílias de genes homeobox, e que contribui para a especificidade de ligação ao DNA (DEL BENE; WITTBRODT, 2005). Esses genes apresentam-se dispersos pelo genoma e, assim como os HOX, os homeobox não agrupados também apresentam homologia com genes da *Drosophila*. Entre esses genes podemos citar: os *PAX*, os *MSX*, os *EMX*, os *OTX* e os *DLX*, que são homólogos, respectivamente, ao “*paired*”, “*muscle segment homeobox*”, “*empty spiracles*”, “*orthodenticle*” e “*distal-less*” (CILLO et al., 1999).

Figura 2.3 – Algumas classes de homeoproteínas que possuem domínios adicionais (ABATE-SHEN, 2002)

As homeoproteínas atuam como fatores de transcrição graças a sua ligação ao DNA através da sequência de bases TAAT e podem agir, tanto como ativadores

quanto como repressores da transcrição. Até agora, pouco se sabe sobre os genes alvo dos homeobox e isso se deve em grande parte pela capacidade seletiva que essas proteínas têm *in vivo*. Acredita-se que a especificidade das homeoproteínas esteja ligada, além de a sua sequência, a diversos níveis de regulação, incluindo controle pós-transcricional, transporte núcleo-citoplasma e interações entre proteínas (Figura 2.5) (ABATE-SHEN, 2002).

Figura 2.4 – Na parte superior temos os genes Hox da *Drosophila* (HOM-C) que estão alinhados com os seus homólogos em humanos (HOX A, B, C e D) e suas respectivas posições cromossômicas (GRIER et al., 2005)

O trabalho realizado por Lewis (1978) demonstrou que o complexo gênico homeótico Bithorax é responsável por codificar proteínas que são capazes de controlar o desenvolvimento torácico e abdominal da *Drosophila*. Esse estudo foi pioneiro em demonstrar que, durante a sua função normal, os genes homeóticos promovem uma identidade celular distinta de acordo com a posição espacial das

células ao longo do eixo antero-posterior da *Drosophila*, e que a combinação de genes homeóticos expressos em uma célula concede identidade morfológica a um segmento de um grupo animal (MARK; RIJL; CHAMBOM, 1997).

Figura 2.5 – Esquema das modificações pós traducionais de homeoproteínas. M: modificações pós traducionais; GTF: fator de transcrição geral, do inglês “general transcription factor” (ABATE-SHEN, 2002)

Por participarem tão intensivamente do processo de proliferação e diferenciação celular, acredita-se que os genes homeobox tenham um grande envolvimento com o controle do ciclo celular e apoptose e por isso, a interação dos homeobox com esses processos vem sendo fortemente estudada (Figura 2.6) (FORD, 1998; CILLO et al., 2001; DEL BENE; WITTBRODT, 2005).

Observou-se que o *HOX11* é capaz de anular o ponto de checagem da divisão celular na fase G2 através da interação com a proteína fosfatase 2A (FORD, 1998; CILLO et al., 2001). O gene *PITX2* é capaz de induzir a expressão de genes controladores da fase G1 do ciclo celular, como ciclina D1, D2 e c-Myc (BAEK et al., 2003). Acredita-se que os genes *MSX* sejam capazes de inibir a diferenciação celular impedindo que a célula saia do ciclo celular. Esse modelo pode ser

comprovado em camundongos com defeitos na diferenciação em células epiteliais e mesenquimais da glândula mamária, que têm expressão aumentada de *Msx1* e que tiveram um aumento na ciclina D1 e CDK4 (HU et al., 2001).

Figura 2.6 – Genes Homeobox e os seus alvos no ciclo celular. As linhas azuis indicam ativação ou repressão direta, as linhas vermelhas mostram interação proteína-proteína, as linhas verdes mostram ativação ou repressão indireta e as linhas pretas indicam interações que ainda não se mostraram como diretas (DEL BENE; WITTBRODT, 2005)

2.3.1 genes homeobox e câncer

Durante a carcinogênese diversos genes homeobox apresentam-se alterados, tanto para ganho quanto para perda de função (FORD, 1998). Entre os genes que apresentam ganho de função podemos citar o *HOXB7* que promove proliferação celular através da ativação do bFGF em melanoma (CARE et al., 1996). O

homeobox *SIX1* foi detectado em diversas linhagens celulares, incluindo linhagens celulares de carcinoma mamário primário e metastático. Esse gene também tem um aumento da sua expressão em rabdomiossarcomas, sendo correlacionado com a formação de metástases, em crianças. Durante a hematopoiese, a expressão de *HOXA10* foi relatada em células precursoras mielóides e, em camundongos, a sua superexpressão leva a proliferação celular (DEL BENE; WITTBRODT, 2005).

A família de genes PAX é, entre os homeobox, a que apresenta uma associação com a oncogênese melhor estabelecida. O gene *PAX5* possui expressão alterada em glioblastoma e meduloblastoma, além de estar envolvido na translocação t(9;14) na leucemia linfoplasmocitóide. O *PAX2* e o *PAX8* foram detectados no tumor de Wilms e o *PAX3* está associado à diferenciação anormal de melanócitos (CILLO et al., 1999).

O *CUX-1*, um gene homeobox não agrupado, está expresso no desenvolvimento do rim e no trato urinário e guia a diferenciação terminal durante a nefrogênese, apresentando-se superexpresso em cistos epiteliais no rim policístico (VANDER HEUVEL et al., 1996; CILLO et al., 1999).

O gene *CDX2*, que é expresso no intestino durante o desenvolvimento e também em fase adulta, é um exemplo de homeobox que tem expressão diminuída em linhagens celulares de carcinoma (EE et al., 1995). De forma semelhante ao *CDX2*, o *NKX3* é expresso dos estágios iniciais da formação da próstata até a idade adulta e é necessário para a diferenciação do epitélio da próstata. Camundongos com mutações homozigóticas ou heterozigóticas nesse gene desenvolvem uma lesão pré-maligna chamada neoplasia epitelial prostática. Embora essa lesão não progrida para um carcinoma por si só, ela acelera a progressão maligna em

colaboração com a perda de função do gene supressor de tumor PTEN (ABATE-SHEN, 2002).

Nakamura et al. (1999) observaram a existência de uma translocação t(1;11)(q23;p15) que dá origem a fusão entre o gene *NUP98* e o gene homeobox *PMX1*. O transcrito quimérico *NUP98-PMX1* foi detectado em casos de leucemia mielóide aguda e observou-se que o homeodomínio do *PMX1* foi conservado nessa translocação, sugerindo, para os autores, que a superexpressão desse gene esteja funcionando como um fator de transcrição oncogênico.

Chen et al. (2005) avaliaram a presença dos 39 genes *HOX* em carcinomas epidermóides de esôfago e em tecidos não tumorais adjacentes. Eles observaram que oito genes *HOX* estavam presentes somente na neoplasia (*HOXA10*, *HOXA13*, *HOXB7*, *HOXC4*, *HOXC8*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD13*) e cinco estavam expressos tanto em CE quanto em tecido não tumoral (*HOXA7*, *HOXA9*, *HOXC6*, *HOXA2*, *HOXC9*), sendo que três deles apresentaram expressão muito superior na neoplasia maligna (*HOXA7*, *HOXA9*, *HOXC6*). Acredita-se que os cinco genes expressos em ambos os tecidos tenham a função de manter a estrutura normal da mucosa esofágica, enquanto os oito que estão presentes apenas no CE, acrescidos dos outros três que possuem expressão superior na neoplasia maligna, estejam envolvidos no processo de carcinogênese.

Até agora, poucos trabalhos relacionaram os genes homeobox com o CE de boca. Libório (2004) utilizou as técnicas de RT-PCR e hibridização *in situ* para verificar a presença dos transcritos do gene *PITX1* em CEs de boca e em tecidos não-tumorais adjacentes. O transcrito do *PITX1* sofreu amplificação em 86,2% dos casos avaliados, sendo 28% apenas nos tumores, 16% nos tecidos não tumorais e 56% em ambos tecidos. A hibridização *in situ* mostrou uma marcação predominante

no componente epitelial, sendo que de maneira geral, o sinal foi mais intenso no tecido não tumoral adjacente quando comparado com a neoplasia maligna. Zhu et al. (2004) estudaram a expressão do gene homeobox *QUOX1* em CEs de boca. Eles observaram que em tecido adjacente não tumoral não houve expressão do gene. No entanto, em tecidos displásicos houve um aumento da expressão. Esses achados sugerem que os genes homeobox possam funcionar como um marcador biológico de malignidade e de proliferação do CE de boca.

2.4 O Gene *PMX1*

Os genes *PMX* (Paired Mesoderm Homeobox) são dois, o *PMX1*, também conhecido como *PRX1*, *MHOX*, *K2* e *PRRX1*, e o *PMX2* (*S8* e *PRRX2*). Eles possuem o homeodomínio semelhante ao do gene Paired da *Drosophila*, com exceção da presença do aminoácido lisina na posição 50 ao invés da serina, e por isso fazem parte da família Paired dos genes homeobox. Na sua estrutura, também podemos observar a presença de um domínio conservado na região carboxi-terminal, cuja sequência é semelhante à encontrada no fator de transcrição *Aristaless* da *Drosophila* e, por essa razão, os genes *PMX* fazem parte da sub-família *Aristaless*. De acordo com a sua função, os genes da sub-família *Aristaless* são divididos em grupos, sendo que os *PMX* estão agregados no grupo I que é o grupo dos genes que estão presentes no mesênquima e mesoderma, e participam da esqueletogênese (TEN BERGE et al., 1998; MEIJLINK et al., 1999).

Norris et al. (2000) utilizaram a técnica de hibridização in situ por fluorescência para detectar em quais cromossomos humanos os genes *PMX1* e *PMX2* se localizam. Eles observaram que o *PMX2* se localiza no cromossomo 9q34.1 e o *PMX1* no cromossomo 1q23. O gene *PMX1* possui sete exons, em uma região cromossômica de 75kb, sendo que apenas cinco exons estão presentes em humanos. Podemos observar que esse gene codifica duas isoformas distintas, a Pmx1a (NCBI: Nucleotide NM_006902) e a Pmx1b (NCBI: Nucleotide NM_022716), que diferem pelo “splicing” alternativo do exon seis, presente no *PMX1A*, mas não no *PMX1B* (NCBI. Evidence Viewer: *PMX1*).

Os padrões de expressão dos genes *PMX1* e *PMX2* parecem se sobrepor, pois ambos são encontrados expressos nas mesmas estruturas e atuando de forma parecida. Eles são 97% idênticos em seus homeodomínios e 64% na molécula toda. Essa alta porcentagem de semelhança entre as suas moléculas, assim como a expressão e organização genômica similares, sugere que esses genes sejam resultado de uma duplicação gênica (TEN BERGE et al., 1998; NORRIS; KERN, 2001).

Cserjesi et al. (1992) foram os primeiros a descrever o gene Pmx1. De acordo com os seus estudos, eles observaram que essa proteína é capaz de se ligar a seqüências ricas em AT próximas ao promotor muscular da creatina quinase, o que a configura como um fator de transcrição específico para músculo. Eles também constataram que a expressão dessa proteína é restrita a células originárias do mesoderma e que, ao contrário de outros genes homeobox, o Pmx1 não está expresso no sistema nervoso, sendo a sua maior concentração localizada nos membros e arcos viscerais do embrião de camundongo, e no músculo esquelético, coração e útero de adultos.

Com o objetivo de comparar os padrões de expressão do Pmx1 e do Pmx2, Leussink et al. (1995) utilizaram a técnica de hibridização *in situ* com sonda radioativa para avaliar a expressão desses genes em embriões de camundongos em diferentes fases de desenvolvimento. Foi observado que apesar dos sítios de expressão dos genes Pmx1 e Pmx2 diferirem em alguns aspectos, eles sobrepõem-se no mesênquima do crânio em formação, arcos branquiais, membros e mesoderma axial. O Pmx1, além de estar presente no telencéfalo em desenvolvimento e na parte ventral do diencéfalo, também parece estar ligado à diferenciação celular nas válvulas cardíacas, tendões e células musculares lisas de vasos sangüíneos. Entretanto, estudos que utilizaram marcadores imunoistoquímicos para células de músculo liso e proteínas da matriz extracelular, com o objetivo de relacionar a expressão dos genes Pmx1 e Pmx2 com marcadores de diferenciação celular, revelaram que esses genes estão mais envolvidos com a síntese de matriz na parede vascular do que com a diferenciação de células de músculo liso (BERGWERFF et al., 1998).

Um trabalho realizado com camundongos mutantes para os genes Pmx1 e Pmx2 ajudou a elucidar a função desses genes no desenvolvimento. Os embriões Pmx1^{-/-} exibiram malformações craniofaciais, vertebrais e nos ossos dos membros, e os camundongos recém-nascidos sofriam de fadiga respiratória e morreram logo após o nascimento. Uma outra importante característica observada foi a vascularização alterada com o posicionamento anormal do arco aórtico e uma perda da direção e alongamento do ducto arterioso. Os camundongos Pmx2^{-/-} foram viáveis, apresentando apenas uma função cardíaca alterada. Os camundongos Pmx1^{-/-} e Pmx2^{-/-} exibiram um agravamento das alterações encontradas em Pmx1^{-/-} e, como esses, morreram logo após o nascimento (BERGWERFF et al., 2000).

A morte dos camundongos $Pmx1^{-/-}$ e $Pmx1^{-/-}$ e $Pmx2^{-/-}$ no período perinatal, associada a fadiga respiratória e formação anormal do ducto arterioso e arco aórtico, levantou a possibilidade da participação do $Pmx1$ na vascularização do pulmão (DETTMAN; STEINHORN, 2004). Jones et al. (2002) constataram a ausência do RNA mensageiro do $Pmx1$ e $Pmx2$ em artérias pulmonares de camundongos adultos, mas ambos estão presentes durante a degradação da matriz extracelular necessária para o desenvolvimento de doença vascular. Ihida-Stansbury et al. (2004) observaram que células endoteliais em diferenciação no mesênquima de pulmão expressam $PMX1$. Para avaliar se o $PMX1$ promove a diferenciação celular, eles transfectaram células de mesoderma de pulmão embrionário com a sequência completa do cDNA desse gene. Eles constataram que as células adquiriram características de células endoteliais e em Matrigel, desenvolveram a capacidade de formação de vasos.

A inativação dos genes $Pmx1$ e $Pmx2$ foi utilizada para avaliar quais defeitos ósseos os embriões de camundongos apresentavam. Observou-se que camundongos com a inativação do $Pmx2$ não apresentaram defeitos, enquanto os com inativação do $Pmx1$ exibiram alterações no ouvido externo, médio e interno, além de redução ou perda de ossos do crânio, mandíbula atrofiada e com fenda e alterações nos membros. O fenótipo apresentado pelos camundongos com perda do $Pmx1$ e $Pmx2$ era caracterizado pelo agravamento das características descritas para a inativação $Pmx1$. Observou-se também a presença de apenas um incisivo ou ausência total desses dentes na mandíbula, fato que foi acompanhado da expressão ectópica de $Fgf8$, $Pax9$ e $Patched$, o que sugere que a $Pmx1$ esteja envolvida na interação epitélio-mesênquima na mandíbula (TEN BERGE et al., 1998; LU et al., 1999).

Uma outra importante evidência que sugere a correlação entre os genes *Pmx* e a interação epitélio-mesênquima foi observada por Ten Berge et al. (2001). Eles verificaram que embriões de camundongo com a inativação de *Pmx1* e *Pmx2* apresentavam um decréscimo na proliferação do mesênquima do arco mandibular na área medial, e no epitélio bucal adjacente a esse mesênquima a expressão do *Shh* apresentase extremamente reduzida. Esse dado indica que, de uma forma indireta, os genes *Pmx* regulam o *Shh*.

Chesterman et al. (2001) desenvolveu um anticorpo para a proteína *Pmx1*, com o objetivo de verificar se os padrões de expressão encontrados do RNA mensageiro coincidem com o da proteína. Tanto o mesênquima craniofacial, quanto o dos membros, apresentaram os mesmos padrões de expressão, no entanto, não se detectou expressão da proteína no coração nem de embriões nem de camundongos adultos, o que havia sido verificada para o RNA mensageiro. Isso demonstra que o *Pmx1* sofre controle pós-transcricional.

Com o objetivo de descobrir quais fatores de transcrição interagem com o domínio bZip, que promove a ligação da oncoproteína *Maf* ao DNA, durante a formação de complexos funcionais, Kataoka et al. (2001) observaram que a *Pmx1* se liga a essa região através do seu homeodomínio. Eles constataram que essa interação inibe a capacidade de ligação da *Maf* ao DNA, impedindo que ela funcione como um fator de diferenciação celular, no entanto, ela não interfere com a ligação da *Pmx1* ao DNA.

Uma das vias pela qual a homeoproteína *PMX1* parece exercer a sua função de fator de transcrição é através da sua interação com o *SRF*. A *PMX1* interage com o *SRF* através da formação de um complexo protéico estável com a proteína de

ligação TFII-I, aumentando a capacidade de ligação do SRF ao sítio SRE do oncogene *c-Fos* (GRUENEGER et al., 1995, 1997).

A tenascina-C (TN-C) é uma glicoproteína de matriz extracelular que está expressa durante o desenvolvimento embrionário, em neoplasias e na remodelação de tecidos adultos. Diversas funções celulares já foram atribuídas a essa proteína, como proliferação celular, apoptose e diferenciação, além dela estar associada à migração celular. Diversos estudos já mostraram que o homeodomínio do *PMX1* interage com o sítio de ligação do gene *TN-C* promovendo a sua expressão (MCKEAN et al., 2003). Jones et al. (2002) verificou que durante a vascularização, o crescimento de células musculares lisas é aumentado pela elevação de TN-C gerada com a atuação do Pmx1 no sítio promotor desse gene. Ihida-Stansbury et al. (2004) constataram, através de estudos com camundongos mutantes *Pmx1*^{-/-}, que a presença da Pmx1 é crítica para a expressão da TN-C. Na ausência da Pmx1 pode-se observar que a expressão de TN-C é inferior a encontrada em camundongos não mutantes e que a vascularização pulmonar mostrou-se deficiente, levando a morte do camundongo logo após o nascimento.

Os locais de expressão do gene *PMX1* e os padrões de malformações encontrados nos estudos com a sua inibição levantaram a possibilidade da sua participação em síndromes. Norris et al. (2000) avaliaram o DNA de oito pacientes com Disostose Acro-facial de Nager na busca por mutações no *PMX1*, no entanto os seus resultados excluíram esse gene como uma causa da síndrome.

Pouco se sabe sobre a atuação do *PMX1* em neoplasias malignas. Em leucemia mielóide aguda, observou-se a translocação cromossômica t(1;11)(q23;p15) que levou a fusão dos genes *NUP98* e *PMX1*. Durante a fusão, ocorre a adição do domínio Nterminal de *NUP98* ao *PMX1*, que mantém o seu

homeodomínio conservado. Essa fusão leva a alteração da atividade transcricional do *PMX1* o que faz com que ele possa atuar como um fator de transcrição oncogênico (NAKAMURA et al., 1999).

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a possível expressão de transcritos do gene *PMX1* em carcinomas epidermóides de boca e tecidos não tumorais adjacentes, através da técnica de hibridização *in situ*, e analisar se a expressão está relacionada com a morfologia das células neoplásicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos espécimes

A obtenção do material, sem prejuízo para o tratamento global do paciente e feita através de parâmetros cirúrgicos, foi autorizada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (Anexo A), estando a Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) ciente e de acordo. Todos os pacientes incluídos neste projeto foram devidamente comunicados e tiveram assinados seus termos de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

Foram obtidos 16 fragmentos de tecido tumoral e 10 de tecido não tumoral adjacente de pacientes provenientes do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) previamente diagnosticados como portadores de carcinoma epidermóide de boca.

Durante o ato cirúrgico para remoção da lesão, foi retirado um fragmento da porção interna da neoplasia para que não houvesse prejuízo na avaliação histopatológica das margens da lesão. De uma área adjacente, após a retirada da lesão, uma porção de tecido não tumoral foi removida no momento da plastia. O material coletado foi imediatamente fixado em paraformaldeído a 4% e trazido ao nosso laboratório por alunos da Liga Interdisciplinar de Neoplasias Bucais (LINB) da

FOUSP e o diagnóstico histopatológico da lesão foi confirmado na Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP.

Posteriormente, os fragmentos foram divididos em duas partes. Uma foi destinada à extração de RNA e para o preparo da ribossonda necessária para a reação de ISH. A outra foi processada e embebida em OCT, e submetida a cortes seriados de 10µm em criostato que foram colocados em lâminas silanizadas, para serem submetidos à técnica de ISH, como descrito abaixo. O tecido ficou sempre armazenado em um freezer a -80°C.

Os dados clínicos dos pacientes também foram coletados por alunos da LINB. A participação desses alunos estava de acordo com as normas do hospital e teve a autorização do chefe do serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP.

4.2 Preparação da ribossonda

4.2.1 extração de RNA

Foi obtido RNA total dos fragmentos dos tecidos tumoral e não tumoral adjacente, utilizando-se o método do TRIzol™ conforme instruções do fabricante (GIBCO BRL – Invitrogen). Esses fragmentos foram pesados e, individualmente, transferidos para um almofariz de porcelana limpo com RNase Away (Invitrogen), e estéril contendo nitrogênio líquido (N₂). O material foi macerado com pilão até pulverização completa em N₂, quando se adicionou 1ml de TRIzol™ para cada

100mg de tecido. O material obtido após homogeneização foi transferido para tubos tipo Eppendorf de 1,5ml, mantido durante cinco minutos a temperatura ambiente (TA) e homogeneizado por três minutos, quando foram adicionados 200ml de clorofórmio e o tubo agitado por 15 segundos. Após manter o tubo em repouso durante três minutos, este foi centrifugado durante 15 minutos a 10000 rpm em 4°C. Neste momento, o sobrenadante (fase translúcida contendo o RNA) foi transferido para outro tubo. A este último tubo foram adicionados 500ml de isopropanol, quando foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima durante 10 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo foi então lavado com 1ml de etanol 75%, agitado por 15 segundos, centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm em 4°C. O álcool foi desprezado e o corpo de fundo foi seco a 37°C por 2 minutos e em seguida dissolvido em 30ml de água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma). O RNA obtido foi submetido à leitura em espectrofotômetro (Beckmann DU-640) e utilizado quando se obteve uma razão do OD 260 e 280 entre 1.8 e 2.1.

A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de integridade. Para isso, 5ml de RNA foram misturados a 15ml de tampão de amostra [10ml formamida, 3,5ml formaldeído 37% e 2ml MOPS (MOPS 0,2M pH7,0, acetato de sódio 50mM, EDTA 5mM pH8,0)] e 5ml de tampão de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,4% e água DEPC q.s.p. 20ml), e aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio 0,5mg/ml. A integridade foi considerada ótima quando as bandas 28S e 18S de rRNA estavam nítidas e intensas, numa razão de 2:1. Os procedimentos descritos acima, bem como os relatados a seguir, foram efetuados em condições livres de Rnase.

4.2.2 RT-PCR

Após obtenção do RNA de cada amostra realizou-se a síntese de cDNA através da técnica RT-PCR (Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction, Invitrogen, Carlsbad, CA). O protocolo, segundo instruções do fabricante, foi feito com utilização da enzima Superscript II (Invitrogen) da maneira descrita a seguir.

Após a quantificação, a concentração em mg/ml do RNA foi calculada através da fórmula $OD \times Fd$ (fator de diluição) $\times 40/1000$. A partir disso, determinou-se o volume de RNA que continha 4 μ g e a esse volume foram adicionados 2 ml de OligoDT (Invitrogen) e quantidade de água DEPC alcalina necessária para completar um volume total de 20ml. Os tubos foram então aquecidos a 70°C por 10 minutos, resfriados em gelo picado por 5 minutos e tratados com 4ml de solução tampão apropriada (5x buffer), 2ml de DTT (Ditiotreitol) e 1ml de dNTP a 10mM (desoxinucleotídeo trifosfato). Os tubos foram agitados por 15 segundos e mantidos a 25°C durante 10 minutos e então aquecidos por 2 minutos a 42°C. Aos tubos foi adicionado 1ml da enzima Superscript II (Invitrogen) e em seguida mantidos a 4°C durante 50 minutos. A reação foi finalizada a 70°C por 15 minutos a fim de neutralizar a enzima. Os cDNAs, assim obtidos, foram armazenados em freezer a -20°C para uso.

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction, Invitrogen) através de um par de iniciadores específicos para exons diferentes, que amplificavam as duas variantes (PMX1a e PMX1b) do gene PMX1. Os iniciadores utilizados foram confeccionados utilizando-se o programa Gene Tool 1.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá, <http://biotools.com>) tomando-se por

base a seqüência do gene obtida do banco de dados do NCBI (Nucleotide NM_0227216). A tabela 4.1 mostra os dados referentes ao gene *PMX1* obtidos do banco de dados, bem como a seqüência dos iniciadores e o tamanho do produto por eles amplificado.

Tabela 4.1 – Dados referentes ao gene *PMX1*, iniciadores utilizados, e tamanho do produto

Gene	PMX1
Número de Acesso no Gene	NM_022176
Posição Cromossômica	1q24
Iniciador senso	5' AGC GTT TGG TGT TGA TTC GAG 3'
Iniciador anti-senso	5' CTG AAA CCA CAC CTG CAC TC 3'
Tamanho do produto	488 pb

As reações de PCR abaixo discriminadas foram otimizadas inicialmente utilizando-se cDNA de embrião de camundongo (E14,5), utilizado como controle positivo. Aos tubos de 500 µl foram acrescentados os seguintes reagentes: cDNA, iniciadores senso e antisenso, dNTP, tampão (10X), magnésio, enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen do Brasil) e água destilada/autoclavada para completar 25ml de solução. A tabela 4.2 mostra os volumes e as respectivas concentrações dos reagentes utilizados nessas reações.

Os tubos com os reagentes já citados foram levados ao termociclador PTC-100 Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc) onde foram submetidos a um pré-tratamento de denaturação à 94°C por 3 minutos, seguidos por 41 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 58°C/50 segundos, extensão a 72°C/1 minuto e, após o ciclo final, houve uma extensão adicional de 7 minutos a 72°C.

Tabela 4.2 – Volumes e concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR

Reagente	Volume	Concentração Final
Tampão 10X	2,5µl	1X
Magnésio (MgCl ₂)	1,0µl	2mM
DNTP (10mM)	1,0µl	400µM
Iniciador senso	0,5µl	5pmol
Iniciador anti-senso	0,5µl	5pmol
Taq DNA polimerase	0,5µl	2U/25µl
cDNA	1,0µl	4µg/µl

Os resultados das reações foram avaliados em gel de agarose a 1% (Invitrogen) contendo brometo de etídio e visualizados em transiluminador com luz UV, e a seguir fotografados com câmera Polaroid para documentação.

4.2.3 subclonagem e transformação

O transcrito amplificado por RT-PCR foi inserido em vetor pCR 2.1 utilizando-se o sistema TOPO TA de clonagem (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A solução de clonagem foi preparada em um tubo através da mistura de 2µl do produto de PCR fresco, 1µl de solução salina apropriada, 1µl do vetor TOPO e 2µl de água estéril. Trinta microlitros das bactérias *E. coli* fornecidas com o kit (One Shot) ficaram incubadas em gelo por 30 minutos com 2µl dessa solução de subclonagem preparada, e a seguir sofreram aquecimento rápido deixando-se por 30 segundos em banho-maria a 42°C. O tubo foi imediatamente colocado no gelo, e a ele adicionados 250µl do meio SOC com MgCl₂, em presença de lamparina acesa, e incubado sob vigorosa agitação (200 rpm) a 37°C por 1 hora, de maneira que os

tubos ficassem adequadamente fechados, horizontais e presos a um suporte. Foram preparadas quatro placas de agarose com ampicilina 75 mg/ml. Usando técnica estéril, 40, 60, 80 e 100µl da solução plasmídio-bactéria foram transferidos para placas e espalhadas com alça de platina na presença de lamparina acesa. A alça foi sempre levada ao rubro entre cada procedimento. As placas assim preparadas foram fechadas e colocadas invertidas na estufa onde ficaram incubadas a 37°C durante 18 horas. Após o crescimento, algumas colônias bacterianas foram selecionadas, removidas de cada placa e transferidas para diferentes tubos Falcon de polietileno contendo 2ml de meio LB Broth e 2µl de ampicilina (75 µg/µl). Esses tubos ficaram sob vigorosa agitação durante 8 horas a 37°C, até turvar, e deles foi coletada uma amostra para extração de DNA e feita a confirmação da presença do inserto por PCR utilizando-se iniciadores específicos.

A porção da amostra a ser seqüenciada foi manipulada da maneira a seguir: foram removidos 70µl das amostras turvas contidas no tubo Falcon, e separadamente adicionadas em tubos Eppendorf contendo 30µl de água estéril. Cada tubo foi submetido à fervura em banho-maria a 95°C por 10 minutos, submetido à centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos e 70µl do seu sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, utilizou-se 5µl desse volume para amplificação por PCR. As amostras foram então corridas em gel de agarose a 1% e a intensidade de suas bandas foi comparada com aquelas do padrão a fim de se obter uma estimativa da quantidade de cDNA presente nesses produtos e que correspondesse a pelo menos 20 ng. Foram então feitas purificações desses produtos com a utilização da enzima Exosap (kit Exosap®, Invitrogen). Para isso, foram adicionados 6µl da enzima Exosap em 15µl do produto de PCR e cada tubo contendo a mistura foi submetido à temperatura de 37°C por 1 hora, 80°C por 15

minutos e 4°C por 2 horas. Feito isso, 1µl do produto purificado foi corrido em gel de agarose, fotografado e o restante do seu produto enviado para o seqüenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, juntamente com os iniciadores específicos para o gene *PMX1*. A figura 4.1 mostra parte do cromatograma obtido após o sequenciamento de uma região do transcrito do gene *PMX1* amplificado por RT-PCR.

Figura 4.1 – Cromatograma de uma região do gene *PMX1* obtido após o sequenciamento do produto amplificado por RT-PCR

4.2.4 transformação do plasmídio

Após o seqüenciamento, as bactérias foram colocadas para crescer a fim de dar prosseguimento às etapas que visavam à purificação do DNA plasmidial contendo o inserto, e a confecção das sondas. Dessa maneira, 500ml de meio LB Broth e 500µl de ampicilina (na concentração de 75µg/µl) foram colocados em um frasco estéril, e a ele adicionado o conteúdo de um dos tubos turvos previamente preparados contendo as bactérias com o vetor e inserto seqüenciado. Esse frasco permaneceu na estufa a 37°C sob agitação por aproximadamente 18 horas.

No dia seguinte, uma alíquota da suspensão bacteriana foi retirada, misturada com glicerol na concentração de 6:1 e congelada a -80°C, como reserva. O restante

foi transferido para frascos de 250ml e centrifugado a 6000 rpm durante 15 minutos, a 20°C, e o corpo de fundo resultante, submetido à extração e purificação de DNA através do sistema Wizard® Plus Maxipreps (Promega WI, USA). O corpo de fundo foi dissolvido com 15ml de solução de suspensão celular (Tris-HCl 50mM, pH 7.5; EDTA 10mM; RNase A 100µg/ml) e a este volume foi adicionado 15ml de solução de lise (NaOH 0.2M; SDS 1%), permanecendo sob agitação por aproximadamente 30 minutos. Quando a solução se tornou clara e viscosa foi acrescentado ao volume 15ml de solução neutralizadora e o total centrifugado a 9500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) em rotor J.A 14.0 da Centrífuga Beckman. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo de centrífuga de 50ml sob filtração com o auxílio de gaze estéril, e foi adicionado a este ½ volume de isopropanol para em seguida ser centrifugado novamente a 9500 rpm durante 15 minutos à TA. O sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo obtido foi dissolvido com 2ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.5; EDTA 1mM) e então acrescido de 10ml de resina pré-aquecida a 30°C.

A mistura DNA-resina foi transferida para colunas, acondicionadas a um aparato de vácuo e submetidas a dois ciclos de lavagem com as seguintes soluções: NaCl 85mM; Tris-HCl pH 7.5, 8.5mM e EDTA 2mM e intercaladas com a aplicação de vácuo. As colunas foram lavadas com álcool 80% e secas a vácuo por 5 minutos e então, inseridas em tubos Corning de 50ml e centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos em rotor JS7.5. Em seguida, foram transferidas para novos tubos e adicionou-se 500µl de tampão TE pré-aquecido. Após 2 minutos foram submetidas a nova centrifugação de 2500 rpm por 5 minutos. O DNA plasmídial eluído foi transferido para tubo eppendorf e estocado a 4°C. A concentração final do DNA foi obtida por densidade óptica em espectrofotômetro (Beckmam DU-640).

4.2.5 confecção da ribossonda

O plasmídio contendo o inserto do transcrito do gene *PMX1* (488pb) foi linearizado com enzimas de restrição (Figura 4.2) e transcrito, com uso de RNAs polimerases, em sondas senso e antisenso a fim de serem utilizadas nas reações de hibridização *in situ*. A sonda antisenso para o *PMX1* foi gerada com a RNA polimerase SP6, após linearização do plasmídio com a endonuclease de restrição *EcoR5*, e a sonda senso foi transcrita com a polimerase T7, após digestão com a endonuclease de restrição *BamH1*.

Figura 4.2 – Gel de agarose a 1% mostrando o DNA plasmídio e o DNA linearizado. PP= padrão de pares de base; PI=DNA plasmídio; L1=linearização com enzima *EcoR5*; L2=linearização com enzima *BamH1*

A digestão do plasmídio contendo o inserto se deu na presença do tampão indicado (1X) para obtenção de 100% de atividade para a endonuclease utilizada e de 1 a 2 unidades da enzima, na temperatura ótima conforme instruções do fornecedor, em um total de solução preparada de 20µl, durante aproximadamente 6 horas a 37°C. Feito isso, 2µl do plasmídio digerido (DNA linearizado) com a enzima de restrição foi transcrito com 1µl da polimerase de RNA (0,5%), em um tubo de 1,5 ml, na presença de tampão de transcrição (5X), DTT (Ditionotreititol) 1mM, nucleotídios

(ATP, CTP, GTP 10mM, UTP 6,5mM e UTP marcado com digoxigenina 3,5mM), inibidor de RNase (40 unidades), e água DEPC para completar 20µl de solução no tubo de cada sonda, durante 2 horas a 37°C. O restante do DNA linearizado foi armazenado a 4°C para futuras transcrições em sonda.

A inspeção da sonda transcrita em RNA foi efetuada por meio de gel de agarose a 1% em TAE contendo Brometo de Etídio (concentração de 5mg/ml). O resultado foi observado numa câmara de transluminescência e documentado em filme Polaroid.

Figura 4.3 – Gel de agarose a 1% mostrando o produto de transcrição com RNA polimerases T7 (S1 e S3) e SP6 (S2 e S4)

Após a inspeção, com a finalidade de precipitação do RNA, foi adicionado ao restante do volume do tubo 2µl de Dnase, e a mistura incubada a 37°C durante 15 minutos, após os que foram adicionados 10µl de cloreto de lítio 4M, 300µl de etanol 100% e 100µl de água DEPC. As sondas assim produzidas foram agitadas e mantidas a -20°C até o momento do uso.

4.3 Hibridização *in situ*

O método utilizado foi o descrito previamente por Wu e Oh (1996) com algumas modificações. As lâminas contendo cortes dos tumores e tecidos não tumorais adjacentes foram descongeladas e deixadas para secar por aproximadamente três horas, antes de serem submetidas à solução de paraformaldeído 4%. A seguir, elas foram transferidas para recipientes (TissueTek, VWR) onde ficaram imersas, seqüencialmente, em glutaraldeído 0.2% em PBS durante 20 minutos à TA, 6% H₂O₂, proteinase K 10µg/ml (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), glicina 2 mg/ml, e paraformaldeído 4% com glutaraldeído 2%. Essas soluções foram preparadas em PBS/0.1% Tween 20 (PBT), e cada incubação foi alternada com lavagens no tampão de PBT. As lâminas assim processadas foram pré-hibridizadas em grupo de quatro num saco plástico selado pelo calor, e imersas na solução de pré-hibridização onde ficaram durante 1 hora a 50°C no forno de hibridização. A solução de pré-hibridização consiste em formamida 50%, 5X SSC (pH 4.5), heparina 50 µg/ml, RNA de levedura 50 µg/ml, 1% SDS e água para completar 50 ml, pré-aquecida a 50°C.

Antes de ser adicionada à solução de pré-hibridização, a sonda de RNA foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 14.000 rpm, lavada com 500µl de etanol 70% e centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm. O corpo de fundo foi secado a vácuo por aproximadamente 2 minutos e então dissolvido com 40 µl de água DEPC de onde foram retirados 10 µl para adição em cada saco plástico contendo as lâminas em solução de pré-hibridização. As lâminas ficavam incubadas nessa solução durante toda a noite, no forno de hibridização a 47°C.

No dia seguinte as lâminas foram removidas dos sacos plásticos, e submetidas a lavagem pós-hibridização numa solução estringente a 50°C, com 3 trocas de 10 minutos, num banho-maria sob agitação. Essa solução consistiu de

formamida a 50%, 20X SSC (pH 4.5) à 30%, 10X SDS à 10% e 10% de água, pré aquecida a 47°C. Uma segunda lavagem pós-hibridização foi feita utilizando-se uma solução de formamida à 50%, 20X SSC (pH 4.5) à 12%, e 38% de água, abaixando-se a temperatura para 42°C com 3 trocas de 10 minutos.

As lâminas foram lavadas com uma solução contendo 10% de TBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, 25% de 1M Tris pH 7.5 e 75% de água), 0.1% de Tween 20 e 80% de água (TBST). Em seguida os sítios antigênicos inespecíficos foram bloqueados com soro fetal bovino à 10% nessa mesma solução durante uma hora à TA. Após o bloqueio, as lâminas foram novamente colocadas em grupo de quatro, em um saco plástico selado pelo calor, com uma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina, onde ficaram durante 18 horas a 4°C sob agitação. Essa solução continha soro fetal bovino à 1:300 e anticorpo anti-digoxigenina à 1:2000.

Terminada a incubação com o anticorpo, as lâminas foram lavadas com TBST e então incubadas em NTMT (NaCl 5M à 2%, 2M Tris-HCl pH 9.5, MgCl₂ 2M à 2.5%, Tween 20 à 1% em água). A detecção da reação deu-se no escuro, com NBT (0,075 g/1ml em dimetilformamida 70%) e BCIP (0,05g/1ml em água) misturados com NTMT na concentração de 1:300 e 1:380 respectivamente, durante o tempo necessário para visualização do sinal. A reação de revelação foi bloqueada com PBT e EDTA (0.5M) na proporção de 1:500. O resultado da reação foi analisado e documentado fotograficamente em um microscópio Zeiss, Jenapol.

5 RESULTADOS

Com relação ao perfil dos pacientes incluídos na pesquisa, pudemos perceber que a média de idade está acima dos 55 anos, a maioria é do sexo masculino, leucoderma, fumante e etilista, dados que coincidem com os encontrados na literatura. Quanto ao local da lesão, a região mais freqüente é língua, mas também foram encontrados casos no soalho, trígono retromolar, mento, rebordo alveolar e maxila. Podemos também observar que a grande maioria dos pacientes participantes desse estudo estava com a doença em estágios avançados (estágio clínico III e IV) (Anexo C).

Nos tecidos não tumorais adjacentes pudemos observar sinal de hibridização em todos os casos avaliados com dois padrões de marcação diferentes. Em um deles, observado em 60% dos casos, verificamos a presença do sinal de hibridização nas camadas basal e supra basal (Figura 5.1 – A e B). No segundo padrão, observado em 40% dos casos, o sinal de hibridização estava disperso por todas as camadas do epitélio (Figura 5.1 – C e D). Pudemos também verificar que em ambos os padrões de marcação, algumas células apresentavam um sinal mais intenso que outras (Figura 5.1 – G e H).

Nos tecido hibridizados com a sonda antisenso, e que exibiram sinal de hibridização, pudemos observar que esse se encontrava disperso pelo citoplasma celular e ausente no núcleo (Figura 5.1 – G). A sonda senso foi utilizada como controle negativo e os tecidos hibridizados com ela não exibiram sinal de hibridização (Figura 5.1 – H).

Nos casos de carcinoma epidermóide de boca foi observada a ausência de sinal de hibridização em apenas um caso. Nos demais, nas áreas pouco diferenciadas, pudemos observar um sinal de hibridização muito intenso (Figura 5.2 – A e B). Pôde-se observar a intensa presença dos transcritos nas áreas moderadamente diferenciadas da neoplasia (Figura 5.2 – C e D). Nas regiões com carcinoma epidermóide bem diferenciado, observou-se uma sinalização muito tênue, embora algumas células ao redor de pérolas de queratina se apresentassem fortemente marcadas (Figura 5.2 – E e F). Nas amostras que continham áreas de invasão tumoral, observou-se intensa marcação nas células mais próximas à frente de invasão (Figura 5.2 – G e H).

Figura 5.1 - Localização de transcritos do gene *PMX1* em tecidos não tumorais adjacentes. (A) HE de mucosa de soalho e (B) ISH em corte pareado de (A) exibindo sinal de hibridização nas camadas basal e suprabasal (100X). (C) HE de soalho de boca e (D) corte pareado de (C) com sinal de hibridização disperso por todas camadas do epitélio (100X). (E) HE de mucosa de língua e (F) corte pareado de (E) exibindo sinal de hibridização em todas as camadas do epitélio, porém a intensidade do sinal é variável nas diversas células (25X). (G) Padrão de marcação exibindo sinal de hibridização apenas no citoplasma celular (200X). (H) Tecido hibridizado com sonda senso não exibindo sinal de hibridização (25X)

Figura 5.2 - Localização dos transcritos do gene *PMX1* no carcinoma epidermóide de boca. (A) HE de carcinoma epidermóide de língua e (B) ISH em corte pareado de (A) em área pouco diferenciada exibindo sinal de hibridização muito intenso em células isoladas (100X). (C) HE de carcinoma epidermóide em área de maxila e (D) corte pareado de (C) com área moderadamente diferenciada evidenciando sinal de hibridização intenso (100X). (E) HE de carcinoma epidermóide em rebordo alveolar e (F) corte pareado de (E) com sinal de hibridização fraco em área de carcinoma epidermóide bem diferenciado, embora algumas células ao redor de pérolas de queratina apresentem sinal mais intenso (25X). (G) HE de carcinoma epidermóide em língua e (H) corte pareado de (G) exibindo sinal de hibridização mais intenso nas células do fronte de invasão (25X)

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi observada a presença dos transcritos do gene *PMX1* em CEs de boca. A detecção de transcritos desse gene é importante, pois ainda não há relatos na literatura da sua expressão em boca ou em qualquer outro tecido de origem epitelial e, até agora, todos os relatos da presença do *PMX1* estavam ligados a tecidos de origem mesênquimal.

Estudos relacionando o *PMX1* a oncogênese são escassos. Nakamura et al. (1999) relatam a presença da translocação cromossômica t(1;11)(q23;p15) em leucemia mieloide aguda. Essa translocação promove a fusão dos genes *NUP98* e *PMX1*, sendo que o homeodomínio do gene *PMX1* encontra-se conservado e superexpresso, sugerindo que ele esteja funcionando como um fator de transcrição oncogênico.

Os transcritos do gene *PMX1* foram encontrados em neoplasias malignas pelo Projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço”. Nesse trabalho, os transcritos derivados de tecidos tumorais e não tumorais de boca, laringe, faringe e tireóide passaram por uma análise genômica detalhada para verificar quais genes estavam presentes. Entre os genes encontrados estavam 20 homeobox, sendo um deles o *PMX1*. No entanto, não foi possível verificar se os transcritos encontrados eram provenientes de lesões bucais ou não (REIS et al., 2005). Com base nesses achados, nos propusemos a verificar a presença dos transcritos do gene *PMX1* em CEs de boca utilizando a técnica de hibridização *in situ*. Essa metodologia foi escolhida, pois, apesar dela não ser tão sensível quanto a de RT-PCR, com ela poderíamos ter certeza que os transcritos localizavam-se no componente epitelial

dos tecidos não tumorais adjacentes e nas células neoplásicas dos carcinomas estudados.

Os nossos resultados mostraram que o sinal de hibridização nas amostras de tecido não tumoral adjacente apresentou dois padrões de marcação diferentes, sendo eles, a marcação nas camadas basal e suprabasal e marcação em todas as camadas do epitélio, podendo a intensidade do sinal variar entre as células nos dois padrões. A presença desses diferentes padrões pode estar relacionada com o efeito de campo de cancerização da mucosa bucal. Segundo essa teoria, toda a mucosa bucal pode ter alterações moleculares, embora, morfológicamente, o epitélio não apresente modificações visíveis. Os diferentes padrões de sinal para o gene *PMX1* observados nesse estudo poderiam representar os diversos níveis de alterações moleculares presentes no epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado da mucosa bucal.

Nos CEs de boca estudados, o sinal de hibridização seguiu o mesmo padrão em todas as amostras, sendo intenso nas áreas pouco e moderadamente diferenciadas e fraco, com algumas células com marcação mais intensa, nas áreas bem diferenciadas. Essas células, mais intensamente sinalizadas nas regiões bem diferenciadas, podem representar células que sofreram alterações moleculares recentemente e passaram a expressar o *PMX1*. De acordo com essa idéia, por ser um fenômeno recente, as células que começaram a expressar o *PMX1* ainda não teriam tido tempo de passar pela expansão clonal existente durante a carcinogênese e por isso, poucas células exibiram sinal de hibridização (MOOLGAVKAR; LUEBECK, 2003). De qualquer forma, a presença de transcritos do *PMX1* nessas células mostra a diversidade de fenômenos que ocorre nas células neoplásicas, mesmo naquelas morfológicamente semelhantes.

O fato de encontrarmos o sinal de hibridização mais intenso nas células pouco diferenciadas dos casos de carcinoma epidermóide e, nas camadas basal e supra basal das amostras de tecido não tumoral adjacente, em sua maioria, levanta a hipótese de que esse gene ganhe expressão em células pouco diferenciadas.

Segundo ABATE-SHEN (2002), há três situações nas quais podemos observar a expressão dos genes homeobox durante a oncogênese. Na primeira delas, os homeobox que são expressos apenas em tecidos embrionários voltam a ser expressos em neoplasias malignas que têm origem nesses tecidos. No segundo caso, há uma perda da expressão de genes durante a oncogênese de tecidos que normalmente os expressam. Na última situação, observamos a presença de genes em células tumorais que não apresentavam expressão no tecido normal ou em desenvolvimento. O padrão de expressão demonstrado pelo *PMX1* parece se enquadrar nessa última situação, pois pudemos observar que há um aumento na sua expressão durante a oncogênese e não há relatos na literatura da sua expressão nem tecidos epiteliais durante o desenvolvimento, nem na mucosa bucal normal. Embora tenhamos observado sinal no epitélio morfolologicamente normal analisado, como discutimos anteriormente isso não significa que esse epitélio não esteja alterado em nível molecular.

Todos os estudos realizados até agora apontaram o *PMX1* como um gene de expressão exclusiva de tecidos mesênquimais (LEUSSINK et al., 1995; TEN BERGE et al., 1998, 2001; IHIDA-STANSBURY et al., 2004), sendo que essa é a primeira vez que ele é descrito em tecido de origem epitelial. Situação semelhante foi observada com um outro gene homeobox, o *PROX1*. Esse gene codifica um fator de transcrição essencial para a linfagiogenese embrionária e um trabalho que visava

testá-lo como um marcador para vasos linfáticos detectou a sua presença em 110 das 116 amostras avaliadas de carcinoma mamário (LONGATO et al., 2005).

A transição epitélio-mesênquima foi inicialmente descrita durante o desenvolvimento embrionário, em especial durante a gastrulação, no entanto, estudos atuais sugerem que esse processo seja importante na progressão de carcinomas. Nesse processo, células epiteliais perdem a sua polaridade e a adesão celular, passando por uma profunda modificação em seu citoesqueleto. Elas também passam a exibir um fenótipo migratório, com a perda da expressão de proteínas de epitélio, como a E-caderina e ganho de expressão de proteínas mesênquimais tais como, fibronectina, vimentina, actina de músculo liso e N-caderina (KANG; MASSAGUÉ, 2004). No CE de boca já foi observada a alteração no padrão de expressão, com relação ao tecido normal, de algumas dessas proteínas. Por exemplo, encontramos nessa lesão uma baixa expressão de E-caderina que está associada a um comportamento mais agressivo da lesão e pobre prognóstico, e que também observamos aumento na expressão de Ncaderina (CHEN et al., 2004; DINIZ-FREITAS et al., 2005). Observou-se também, que a proteína vimentina passa a ser expressa principalmente nas lesões pouco diferenciadas (DE ARAÚJO et al., 1993). Por encontrarmos o *PMX1* mais expresso em áreas de carcinoma epidermóide pouco diferenciado, e sua proteína ter sido observada exclusivamente no mesênquima, levanta-se a possibilidade dele poder fazer parte do processo da transição epitélio-mesênquima e ser, assim como a vimentina, um marcador de perda de diferenciação celular.

A via de sinalização e os mecanismos que o gene *PMX1* usa para exercer a sua função ainda não estão estabelecidos. Isso dificulta o entendimento de qual poderia ser o papel dele na oncogênese, no entanto, alguns trabalhos sugerem

alguns possíveis mecanismos: Kataoka et al. (2001) demonstraram que o PMX1 se liga, através do seu homeodomínio, ao domínio bZip das proteínas da família Maf. Essa ligação impede que a Maf se ligue ao DNA, inibindo a sua função de fator de diferenciação celular. Diversos trabalhos já relataram a atuação dos genes da família Maf na diferenciação celular de tecidos como pele em desenvolvimento, cristalino, baço e fígado e na oncogênese de melanoma e mieloma, no entanto não há trabalhos que relatem a presença desses genes em epitélio bucal ou carcinoma epidermóide de boca (OGATA et al., 2004). Pouponnot et al. (2005) estudaram o potencial de transformação celular da MafA, MafB e c-Maf. Eles observaram que, de acordo com o contexto celular, as proteínas Maf podem atuar tanto como oncogenes quanto como supressores de tumor. Por não haver relatos na literatura se há expressão de Maf em epitélio bucal e em carcinoma epidermóide, não podemos ter certeza se o PMX1 estaria inibindo a diferenciação celular na oncogênese do carcinoma epidermóide de boca através dessa via.

Um importante mecanismo de ação do *PMX1* é através da interação com o SRF. O *PMX1* permite a formação de um complexo estável com a proteína de ligação TFII-I que irá aumentar a capacidade de ligação do SRF ao sítio SRE do oncogene *c-Fos*, promovendo a expressão desse gene. Não há relatos na literatura da expressão de SRF em carcinoma epidermóide de boca, no entanto, De Sousa et al. (2002) avaliaram a expressão de c-Fos em mucosa bucal normal e no carcinoma epidermóide. Os seus achados demonstraram a presença do c-Fos no núcleo das células de todos os casos. Na mucosa normal, a marcação encontrava-se na camada supra-basal, e na mucosa adjacente à neoplasia a marcação estava localizada em todas as camadas do epitélio. No carcinoma epidermóide de boca, o resultado foi positivo nos carcinomas bem e moderadamente diferenciados e em

apenas algumas células localizadas na região mais central das lesões pouco diferenciadas.

De acordo com achados aqui descritos, se o *PMX1* estivesse utilizando essa via de sinalização para exercer a sua função, era de se esperar expressão elevada de SRF e c-Fos em neoplasias pouco e moderadamente diferenciadas, e baixa em carcinomas bem diferenciados. A comparação dos achados dos dois estudos sugere que essa via não seja a mais provável de atuação do *PMX1* na oncogênese do carcinoma epidermóide de boca, no entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar a presença do SRF nessa neoplasia.

Um outro mecanismo de atuação do *PMX1* é através da ativação da transcrição da *TN-C*. A *TN-C* é uma glicoproteína de matriz extracelular que possui propriedades anti-adesivas e responsável por diversas funções celulares como proliferação celular, apoptose, diferenciação e migração celular na remodelação de tecidos adultos e em neoplasias (JONES et al., 2002; MCKEAN et al., 2003; IHIDA-STANSBURY et al., 2004). Como a interação entre proteínas da matriz extracelular e células tumorais é fundamental para a invasão tumoral e metástase, levantou-se a hipótese da atuação da *TN-C* na carcinogênese de boca. Ramos et al. (1997) demonstraram a elevada expressão de *TN-C* em carcinoma epidermóide de boca em comparação com o encontrado em mucosa bucal normal. Embora a *TN-C* esteja presente no carcinoma epidermóide, ainda não há evidências de que ela possa servir de parâmetro para prever a taxa de sobrevida e de sobrevida livre de doença (ATULA et al., 2003).

Em 1998, Ramos et al. observaram que as células do carcinoma epidermóide de boca são essenciais para que os fibroblastos passem a expressar a *TN-C*. Esses autores sugerem que as células tumorais ao passarem por um processo de

proliferação passem a liberar fatores que estimularão a expressão de *TN-C* nos fibroblastos. O fato de encontrarmos o *PMX1* expresso em carcinoma epidermóide de boca, em especial nas áreas de frente de invasão, e por ele ser responsável por estimular a expressão de *TN-C* em outros contextos celulares, existe a possibilidade de que esse gene esteja atuando nessa neoplasia através dessa via, facilitando a invasão tumoral.

Os resultados obtidos são importantes para orientar novos estudos. Para entender a real função do *PMX1* na oncogênese do carcinoma epidermóide de boca devemos inicialmente entender qual é o papel dele na mucosa bucal normal. Os resultados obtidos nas amostras de epitélio não tumoral adjacente levantaram a hipótese de que esse gene não seja de expressão exclusiva mesênquimal, contrariando o observado na literatura. No entanto, sabemos que o tecido utilizado pode já ter passado por alterações moleculares, que o levariam a um padrão de expressão gênica diferente, sustentando a hipótese dele não ter expressão em mucosa bucal normal de adulto.

Embora algumas possíveis vias de sinalização tenham sido levantadas, estudos que possam relacionar carcinoma epidermóide de boca, o *PMX1* e as proteínas da família Maf, o SRF e a TN-C devem ser realizados para que um melhor entendimento sobre o papel do *PMX1* na carcinogênese de boca possa ser obtido.

Vale ressaltar que esse estudo verificou apenas a presença de transcritos do *PMX1*, pois ainda não há anticorpos disponíveis, comercialmente, para essa proteína. Chesterman et al. (2001) desenvolveu um anticorpo para o *PMX1* e verificou que os padrões de expressão encontrados do mRNA nem sempre coincidem com o da proteína, o que demonstra que esse gene passa por um controle pós-transcricional. Diante do exposto, fica clara a necessidade de que

novos estudos sejam realizados para avaliar a presença da proteína *PMX1* e, conseqüentemente, validar os resultados obtidos através da detecção dos transcritos.

7 CONCLUSÕES

7.1 Transcritos do gene *PMX1* estão expressos em tecidos no epitélio não tumoral adjacente e em carcinomas epidermóides de boca.

7.2 Os diferentes padrões de sinal de hibridização observados nos casos de tecido não tumoral adjacente sugerem que esse tecido já passou por alterações moleculares.

7.3 O sinal de hibridização mais intenso em populações celulares mais indiferenciadas sugere que o gene *PMX1* tenha um ganho de expressão no carcinoma epidermóide de boca pouco diferenciado.

REFERÊNCIAS¹

Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature Reviews – Cancer* 2002;(2):777-85.

AJCC. American Joint Committee on Cancer. Collaborative staging manual and coding instructions. Version 1.0. Bethesda, MD; 2004. Disponível em URL: <http://www.cancerstaging.org/cstage/csmanualpart1.pdf> [2005 set. 29]
<http://www.cancerstaging.org/cstage/csmanualpart2.pdf> [2005 set. 29]

Ashman JN, Patmore HS, Condon LT, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 2003;89(5):864-9.

Atula T, Hedstrom J, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, Haglund C. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2003;23(3C):3051-6.

Backvall H, Asplund A, Gustafsson A, Sivertsson A, Lundeberg J, Ponten F. Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. *Mutat Res* 2005;571(1-2):65-79.

Baek SH, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, et al. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;(100):3245–50.

Banerjee-Basu S, Sink DW, Baxevanis AD. The Homeodomain Resource: sequence, structures, DNA binding sites and genomic information. *Nucleic Acids Res* 2001;29(1):291-293.

Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signaling and Cancer. *Bioessays* 2000;(22):961-5.

Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Iperen LV, Meijlink F, Poelmann RE. Patterns of paired-related homeobox genes Prx1 and Prx2 suggest

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

involvement in matrix modulation in the developing chick vascular system. *Dev Dyn* 1998;(213):59-70.

Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, Wisse LJ, DeRuiter MC, Wessels A. Loss of function of the Prx1 and Prx2 homeobox genes alters architecture of the great elastic arteries and ductus arterious. *Virchows Arch* 2000;436(1):12-9.

Boncinelli E. Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7(3):331-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2004. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/versaofinal.pdf> [2005 jul. 4]

Brasil. Ministério da saúde. Instituto nacional do câncer. Falando sobre o câncer de boca. 2002. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/falandosobrecancerdeboca.pdf> [2005 jun. 21].

Bui TD, Tortora G, Ciardiello F, Harris AL. Expression of Wnt5a is Downregulated by extracellular Matrix and Mutated c-Ha-ras in the Human Mammary Epithelial Cell Line MCF-10A. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;(239):911-7.

Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4842-51.

Chen KN, Gu ZD, Ke Y, Li JY, Shi XT, Xu GW. Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(3):1044-9.

Chen Q, Lipkina G, Song Q, Kramer RH. Promoter methylation regulates cadherin switchin in squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315(4):850-6.

Chesterman ES, Gainey GD, Varn AC, Peterson Jr RE, Kern MJ. Investigation of Prx1 protein expression provides evidence for conservation of cardiac-specific posttranscriptional regulation in vertebrates. *Dev Dyn* 2001;222(3):459-70.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 2001;188(2):161-9.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncielli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res* 1999;248(1):1-9.

Cserjesi P, Lilly B, Bryson L, Wang Y, Sassoon DA, Olson EN. Mhox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development* 1992;115(4):1087-101.

Cuperlovic-Culf M, Belacel N, Ouellette RJ. Determination of tumour marker genes from gene expression data. *Drug Discov Today* 2005;10(6):429-437.

Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002;8(11):258-67.

De Araújo VC, Pinto Junior DS, De Sousa SO, Nunes FD, De Araújo NS. Vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250(2):105-9.

De Robertis EM, Oliver G, Wright CVE. Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Scient Am* 1990;263(1):46-52.

De Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002;31(2):78-81.

Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(3):449-60.

Dettman RW, Steinhorn RH. Connecting the cells: vascular differentiation via homeobox genes and extracellular matrix in the distal lung. *Circ Res* 2004;94(11):1406-7.

Diniz-Freitas M, Garcia-caballero T, Antunez-lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. In press October 2005.

Ee HC, Erler T, Bhathal PS, Young GP, James RJ. Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am. J. Pathol* 1995; (147): 586–592.

Felsher DW. Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr Opin Gen Dev* 2004;(14):37-42.

Ford HL. Homeobox genes: A link between development, cell cycle and cancer? *Cell Biol Int* 1998;22(6):397-400.

Gailani MR, Bale AE. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(15):1103-9.

Galli R, Fiocco R, De Filippis L, Muzio L, Gritti A, Mercurio S, et al. Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. *Development* 2002;(129):1633–44.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated level of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;(53):3579–84.

Grueneberg DA, Henry RW, Brauer A, Novina CD, Cheriya V, Roy AL, et al. A multifunctional DNA-binding protein that promotes the formation of serum response factor/homeodomain complexes: identity to TFII-I. *Genes Dev* 1997;11(19):2482-93.

Grueneberg DA, Simon KJ, Brennan K, Gilman M. Sequence specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15(6):3318-26.

Hermann RM, Füzesi L, Pradier O, Christiansen H, Schmidberge H. Presence of human papillomavirus-18 and Epstein-Barr virus in a squamous cell carcinoma of the tongue in a 20-year-old patient. Case report and review of the current literature. *Cancer Radiother* 2004;8(4):262–5.

Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis* 1997;18(9):1739-43.

Hu G, Lee H, Price SM, Shen MM, Abate-Shen C. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development* 2001;(128):2373–84.

Huguet EL, Smith K, Bicknell R, Harris AL. Regulation of Wnt5a mRNA Expression in Human Mammary epithelial Cells by Cell shape, Confluence, and Hepatocyte Growth Factor. *J Biol Chem* 1995;270(21): 12851-6.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(2):127-35.

Ihida-Stansbury K, McKean DM, Gebb SA, Martin JF, Stevens T, Nemenoff R, et al. Paired-related homeobox gene *Prx1* is required for pulmonary vascular development. *Circ Res* 2004;94(11):1507-1514.

Jean D, Bernier G, Gruss P. *Six6* (*Optx2*) is a novel murine *Six3*-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech Dev* 1999;(84):31-40.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55(1):10-30.

Johnson N. Tobacco use and oral cancer: A global perspective. *J Dent Educ* 2001;5(4):328-36.

Jones FS, McKean DM, Meech R, Edelman DB, Oakey RJ, Jones PL. Regulation of vascular smooth muscle cell growth and adhesion by paired-related homeobox genes. *Chest* 2002;(121):89S-90S.

Kang Y, Massagué J. Epithelial-Mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell* 2004;118:277-79.

Kataoka K, Yoshitomo-Nakagawa K, Shioda S, Nishizawa M. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation and transforming activities. *J Biol Chem* 2001;276(1):819-26.

Kim MM, Califano J. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 2004;112(4):545-53.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. 7a edição, 2003

Kuper H, Adami HO, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J Intern Med* 2002; 251(6): 455–466.

Leussink B, Brouwer A, El Khattabi M, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Meijlink F. Expression patterns of the paired-related homeobox genes MHox/Prx1 and S8/Prx2 suggest roles in development of the heart and the forebrain. *Mech Dev* 1995;52(1):51-64.

Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978;276(5688): 565-70.

Li X, Perissi V, Liu F, Rose DW, Rosenfeld MG. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* 2002;(297):1180-3.

Libório TN. Transcritos do gene PITX1 em carcinoma epidermóide de boca: amplificação por RT-PCR e localização por hibridização in situ [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, et al. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 1999;(401):279-82.

Longato FA, Martins A, Tomarev S, Reis RM, Costa S, milanezi F, et al. PROX1, a lymphatic-endothelium factor, is overexpressed by breast cancer cells. *Virchows Arch* 2005;(447):119-23.

López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, De-Pancorbo M. Clinical applications of the diagnosis of p53 alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Med Oral* 2002;7(2):108-20.

Loosli F, Winkler S, Wittbrodt J. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev* 1999;(13):649-54.

Lu MF, Cheng HT, Kern MJ, Potter SS, Tran B, Diekwisch, et al. prx-1 functions cooperatively with another paired-related homeobox gene, prx-2, to maintain cell fates within the craniofacial mesenchyme. *Development* 1999;(126):495-504.

McKean DM, Sisbarro L, Ilic D, Kaplan-Albuquerque N, Nemenoff R, Weiser-Evans M, et al. FAK induces expression of Prx1 to promote tenascin-C-dependent fibroblast migration. *J Cell Biol* 2003;161(2):393-402.

Mark M, Rijli FM, Chambom P. Homeobox genes en Embryogenesis and Pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42(4):421-29.

Meijlink F, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC, Ten Berg D. Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol* 1999;(43):651-63.

Moolgavkar SH, Luebeck EG. Multistep carcinogenesis and the incidence of human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38(4):302-6.

Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nature Genet* 1997;(15):179–80

Nagpal, JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 2003;(39):213-21.

Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I. NUP98 is fused to PMX1 homeobox gene in human acute myelogenous leukemia with chromosome translocation t(1;11)(q23;p15). *Blood* 1999,94(2):741-7.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral & maxilofacial*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Norris RA, Scott KK, Moore CS, Stetten G, Brown CR, Jabs EW, et al. Human PRRX1 and PRRX2 genes: cloning, expression, genomic localization, and exclusion as disease genes for Nager syndrome. *Mamm Genome* 2000,11(11):1000-5.

Norris RA, Kern MJ. The identification of Prx1 transcription regulatory domains provides a mechanism for unequal compensation by the Prx1 and Prx2 loci. *J Biol Chem* 2001;276(29):26829-37.

Nunes FD, Almeida FCS, Tucci R, Sousa SCOM. Homeobox genes: a molecular link between development and câncer. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):94-8.

Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992;(69):1073-87.

Ogata A, Shimizu T, Abe R, Shimizu H, Sakai M. Expression of c-maf and mafB genes in the skin rat embryonic development. *Acta histochem* 2004;(106):65-7.

Phippard DJ, Weber-Hall SJ, Sharpe PT, Naylor MS, Jayatalake H, Maas R, et al. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during fetal and postnatal mammary gland development. *Development* 1996;(122):2729–37.

Pleasure SJ. An arrow hits the Wnt signaling pathway. *Trends Neurosci* 2001; 24 (2): 69-71.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;(14):1837-51.

Pouponnot C, Sii-Felice K, Hmitou I, Rocques N, Lecoin L, Druillennec S, et al. Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene*. In press October 2005.

Ramos DM, Chen B, Regezi J, Zardi L, Pytela R. Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;(75):680-7.

Ramos DM, Chen BL, Boylen K, Stern M, Kramer RH, Sheppard D, et al. Stromal fibroblasts influence oral squamous-cell carcinoma cell interactions with tenascin-C. *Int J Cancer* 1997;72(2):369-76.

Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(16):3630-3.

Reis EM, Ojopi EP, Alberto FL, Rahal P, Tsukumo F, Mancini UM, et al. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck, and thyroid cancer. *Cancer Res*. 2005;65(5):1693-9.

Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(11):824-32.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer – a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32(3):233-45.

Scott GA, Goldsmith LA. Homeobox genes and skin development: A review. *J Invest Dermatol* 1993;101(1):3-7.

Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol.* 2002;38(3):235-43.

Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto Jr D. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 2002;31(7):379-384.

Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 2001;(411):349-54.

Ten Berge D, Brouwer A, Korving J, Martin JF, Meijlink F. Prx1 and Prx2 in skeletogenesis: roles in the craniofacial region, inner ear and limbs. *Development* 1998;125(19):3831-42.

Ten Berge D, Brouwer A, Korving J, Reijnen MJ, van Raaij EJ, Verbeek F, et al. Prx1 and Prx2 are upstream regulators of sonic hedgehog and control cell proliferation during mandibular arch morphogenesis. *Development* 2001;128(15):2929-38.

Tole S, Goudreau G, Assimacopoulos S, Grove EA. Emx2 is required for growth of the hippocampus but not for hippocampal field specification. *J Neurosci* 2000;(20):2618–25.

UICC. Union Internationale Contra le Cancer. TNM Classificação dos tumores malignos. 6ª edição. Ana Lúcia Amaral Eisenberg. Rio de Janeiro: INCA, 2004. <http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf> [2005 set. 29]

Vander Heuvel GB, Bodmer R, McConnell KR, Nagami GT, Igarashi P. Expression of a cut-related homeobox gene in developing and polycystic mouse kidney. *Kidney Int* 1996;(50):453-61.

Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab* 2000;69(2):85-100.

World Health Report. The World Oral Health Report 2003. Continuous Improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Oral Health Programme. Geneva, Suíça. Organização Mundial de Saúde, 2003. Disponível em URL: http://www.who.int/oral_health/media/en/orh_report03_en.pdf [2005 jul. 4]

Wu D, Oh SH. Sensory organ generation in the chick inner ear. *J Neurosci* 1996;(16):6454-62.

Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt 5A pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 1999;126(6):1211-23.

Yuen APW, Lam KY, Wei WI, Lam KY, Ho CM, Chow TL, et al. A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *The American Journal of Surgery* 2000;(180):139-43.

Zhu F, Li J, Li WX, Liu ZC, Long X. Overexpression and clinicopathological significance of homeobox gene QUOX1 in oral squamous cell carcinoma. *J Biochem Mol Biol* 2004;37(6):671-75.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL 3671

SAO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa*****APROVAÇÃO***

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.12.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 566/01, intitulado: "Estudo da expressão de genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca", apresentado pelo(a) pesquisador(a) DR. MARCOS ROBERTO TAVARES, do Departamento de CIRURGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 12 de Dezembro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
 Presidente da Comissão Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

Disciplina de Patologia Bucal
Faculdade de Odontologia

Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS- INFORMAÇÃO

I- Dados de identificação do sujeito da pesquisa ou responsável legal

1- Nome do paciente: _____
Documento de Identidade: _____ Sexo: ( ) M ( ) F
Data de Nascimento: ____/____/____.
Endereço: _____ N. _____ Apto. _____
Bairro: _____ Cidade: _____
CEP: _____ Telefone: ( ) _____

2- Nome do responsável legal: _____
Grau de parentesco com o sujeito da pesquisa: _____
Documento de Identidade: _____ Sexo: ( ) M ( ) F
Data de Nascimento: ____/____/____.
Endereço: _____ N. _____ Apto. _____
Bairro: _____ Cidade: _____
CEP: _____ Telefone: ( ) _____

II- Dados sobre a pesquisa científica

Título do protocolo de pesquisa: Estudo da expressão de genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca

Pesquisador: Marcos Roberto Tavares

Cargo: médico assistente

Avaliação do risco da pesquisa

Sem risco( )

Risco baixo(X)

Risco mínimo( )

Risco maior( )

Risco Medio

Duração da pesquisa: 1 ano

III- Informações específicas sobre esta pesquisa e registro de informações e garantias do sujeito da pesquisa.

Recebi as seguintes informações:

A Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas de São Paulo está tentando conhecer melhor os processos genéticos que desenvolvem o câncer de boca, pra isso necessitamos de um pequeno pedaço de tumor 1 cm³, removido após cirurgia para não atrapalhar o estudo de margens, o fragmento será removido do centro do tumor. Sua participação é voluntária, portanto não há nenhum pagamento ou indenização.

Os resultados dos exames serão mantidos em segredo e só você e seu médico saberão seus conteúdos.

Caso o Sr(a) tenha alguma dúvida procure o médico responsável por esta pesquisa no telefone do medico ou dentista.

Autorizo coleta destes materiais para pesquisa

IV- Informações do responsável pela pesquisa para contato em casos de intercorrências clínicas e reações adversas.

Seu nome: Marcos Roberto Tavares

Seu telefone: 30696425

V- Consentimento pós-esclarecimento

Estou recebendo uma via do termo de consentimento pos-informação e entendi o seu conteúdo conforme nesta pagina e no seu verso. Dou autorização para divulgação dos dados obtidos de pesquisa sem que eu seja identificado e de acordo com a legislação vigente. Sei que posso desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem que por isto meu tratamento venha a ser prejudicado.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

São Paulo, ____/____/____.

Assinatura do sujeito da pesquisa
(nome Legível)

Assinatura do pesquisador
(nome legível ou carimbo)

Anexo C – Tabela com o perfil dos pacientes incluídos na pesquisa

Dados clínicos		Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral
Idade Média		60 anos	55 anos
Sexo	Feminino	22,2%	40%
	Masculino	77,8%	60%
Raça	Leucoderma	88,9%	86,6%
	Melanoderma	0 %	6,7%
	Xantoderma	11,1%	6,7%
Fumo	Sim	50%	56,25%
	Não	20%	25%
	Não consta	30%	18,75%
Alcool	Sim	40%	43,75%
	Não	30%	31,25%
	Não consta	30%	25%
Local	Língua	66,7%	66,7%
	Soalho	11,1%	6,6%
	Outros	22,2%	26,7%
Estágio Clínico	I	22,2%	0%
	II	22,2%	20%
	III	33,3%	13,3%
	IV	44, 3%	66,7%

Número do Caso	Fumo	Álcool	Idade	Sexo	Raça	Local	UICC
12	-	-	55	F	L	Língua	III
16	+	+	50	M	L	Língua	III
18	+	NC	87	M	M	Maxila	IV
19	-	-	77	M	L	Lábio.	IV
20	+	+	60	M	L	Soalho	IV
24	+	-	78	F	L	Língua.	I
25	+	+	50	M	L	Mento	IV
29	+	+	56	F	L	Língua	IV
31	NC	NC	50	M	L	Soalho	I
32	+	+	58	M	L	Soalho/ Língua	IV
33	+	+	67	M	L	Língua	II
34	NC	NC	80	M	L	Língua	IV
35	NC	NC	58	M	L	Rebordo	II
36	+	-	49	F	L	Língua	IV
37	-	-	19	M	L	Língua	IV
40	-	-	38	F	X	Língua	II
41	+	+	62	M	L	Língua	IV
43	-	-	17	F	L	Trígono	IV
44	+	+	70	M	L	Língua	II
46	+	+	47	M	L	Língua	IV