LUCIANA FASANELLA MATIZONKAS-ANTONIO

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE TRANSCRITOS DOS GENES *HOXA7*,
HOXC6 E *TGIF* EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

São Paulo

2005

Luciana Fasanella Matizonkas-Antonio

**Análise da presença de transcritos dos genes *HOXA7*, *HOXC6* e
TGIF em carcinomas epidermóides de boca**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matizonkas-Antonio LF. Análise da presença de transcritos dos genes *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de USP; 2005.

São Paulo ____/____/_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:.....

4)Prof(a). Dr(a):.....

Titulação: .....

Julgamento: .....Assinatura:.....

5)Prof(a). Dr(a):.....

Titulação: .....

Julgamento: .....Assinatura:.....

DEDICATÓRIA

Ao Rodrigo, meu marido, pelo seu amor, apoio e compreensão em todos os momentos.

Aos meus pais, Pedro e Iza, por toda uma vida de dedicação, amor, e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes** pela dedicação, disponibilidade e transmissão de conhecimentos nos últimos oito anos. Agradeço também pela amizade e incentivo.

AGARDECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo** e a **Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo** por terem aberto as portas da Disciplina de Patologia Bucal dando-me a oportunidade deste grande aprendizado.

A 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. Karen Ortega**, **Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins** e **Profa. Dra. Andréa Mantesso** pelo convívio, disponibilidade e ensinamentos. À **Prof. Dra. Andréa Mantesso** agradeço ainda pelo incentivo e ajuda profissional, fundamentais neste início de carreira.

Ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da FMUSP, representado pelo **Prof Dr. Alberto Ferraz** , pela parceria e concessão das amostras de tecidos utilizados para o projeto realizado em nosso laboratório.

À **Tatiana Libório** e **Thaís Acquafreda** pelo apoio e amizade.

A todos que trabalharam no laboratório de Patologia Molecular, em especial, **Renata Tucci**, **Elena Riet**, **Adriana Neves**, **Ricardo Mesquita**, **Fabício Bitu**, **Adriana Etges**, **Lineu**, **Nívea**, **Ricardo** e agora mais recentemente **Márcia**, **Vanessa** e **Camila**, pelo convívio, respeito, troca de conhecimentos e amizade.

À **Dra. Maria das Graças da Silva Valenzuela** pela amizade, ajuda, troca de conhecimentos, trabalho em equipe e a ótima convivência no laboratório de Patologia Molecular.

À ex-aluna de iniciação científica Roberta Spener pela sua colaboração.

A todos os colegas e amigos da Pós Graduação da patologia Bucal da FOUSP, pelo agradável convívio e amizade.

A todas funcionárias da Patologia Bucal; Bia, Edna, Elisa, Nair, Néia, Patrícia, e Zilda que sempre estiveram dispostas a me ajudar.

Às bibliotecárias da FOUSP pela correção da normatização deste trabalho.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram sempre ao meu lado e em especial para minha avó Lucia e meu irmão Alexandre.

À FAPESP pelo apoio financeiro, projetos 01/13644-6 e 02/12695-5.

Matizonkas-Antonio LF. Análise da presença de transcritos dos genes *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Os genes homeobox são uma família de genes reguladores que são vitais para vários aspectos do crescimento e diferenciação celular. Recentemente, implicações dos genes *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* na gênese e progressão tumoral vêm sendo verificadas. Entretanto, o envolvimento desses genes em carcinomas epidermóides (CE) de boca ainda não foi demonstrado. A possível presença de transcritos dos genes *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* em carcinomas epidermóides de boca e em tecidos não tumorais adjacentes (TN) foi analisada. Os transcritos dos genes foram amplificados por RT-PCR e sua localização celular determinada por hibridização in situ (ISH) com sondas de mRNA específicas. A amplificação do *HOXA7* foi observada em 70% dos casos sendo 15% apenas nas amostras TN, 45% somente nos CEs e 10% em ambos tecidos. Nenhuma amplificação do *HOXC6* foi observada. O *TGIF* foi amplificado em 80% dos casos, sendo 5% somente nas amostras TN, 20% nos CEs e 55% em ambos tecidos. Análises estatísticas mostraram que não havia diferença significativa entre a amplificação do transcrito *HOXA7* ou *TGIF* e o tipo de tecido analisado. Além disso, nenhuma associação entre a amplificação dos transcritos nas amostras CE e os aspectos clínicos foi observada. O sinal de hibridização in situ foi similar para os transcritos *HOXA7* e *TGIF*. Nas amostras TN o sinal da ISH foi intenso no epitélio, ora disperso sendo mais proeminente na camada espinhosa ora mais proeminente nas camadas basais e suprabasais. Nos CEs os

transcritos foram localizados por toda neoplasia sendo que o sinal era menor em áreas menos diferenciadas. Esses resultados mostram que o *HOXC6* não está envolvido com a carcinogênese oral enquanto que a presença dos transcritos *HOXA7* e *TGIF* principalmente em regiões bem diferenciadas dos carcinomas epidermóides de boca sugere uma participação desses genes nesta neoplasia.

Palavras-Chave: Genes Homeobox; Carcinoma Epidermóide; Reação em Cadeia da Polimerase via transcriptase reversa RT-PCR; Hibridização In Situ

Matizonkas-Antonio LF. Analysis of presence of *HOXA7*, *HOXC6* and *TGIF* transcripts in oral squamous cell carcinoma [Tese de Doutorado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

Homeobox genes comprise a family of developmental regulators that are vital for several aspects of growth and differentiation. Recently *HOXA7*, *HOXC6* and *TGIF* genes have been implicated with carcinogenesis and tumoral progression. However their involvement with oral squamous cell carcinomas (OSCC) has not been demonstrated yet. The possible presence of *HOXA7*, *HOXC6* and *TGIF* transcripts in OSCC and adjacent non-tumoral tissues (NT) was verified. Transcripts were amplified by RT -PCR and its cellular localization was determined by *in situ* hybridization with specific riboprobes. Amplification of *HOXA7* was seen in 70% of cases, 15% only in NT tissues, 45% only in OSCC samples and 10% in both tissues. No amplification of *HOXC6* was observed. *TGIF* was amplified in 80% of cases, 5% only in NT tissues, 20% only in OSCC samples and 55% in both tissues. Statistical analysis showed that there was no significant difference between amplification of *HOXA7* or *TGIF* and the type of tissue analyzed. Moreover, no association between amplification of transcripts in OSCC and clinical aspects was observed. ISH signal was similar for *HOXA7* and *TGIF* transcripts. In NT tissues there was an intense expression in the epithelium, either in basal and suprabasal layers or disperse and more intense in the spinous layer. In OSCC transcripts were localized in all tumoral cells, but in poorly differentiated areas the signal was less intense. These results show that *HOXC6* was not involved in oral carcinogenesis while the presence of

HOXA7 and *TGIF* transcripts in OSSC, mostly in well differentiated regions, suggests a participation of these genes in OSCC.

Keywords: Homeobox Genes; Squamous Cell Carcinoma; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR; In Situ hybridization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Figura 2.1 - (A) Transformação homeótica na drosófila. Na mutação Antennapedia, as antenas foram transformadas em patas, enquanto que na mutação Bithorax, os balanceadores são transformados em asas. (B) Conservação das famílias HOM-C e <i>HOX</i> . A seqüência é conservada em nível de cromossomos e nucleotídeos. Em humanos, as quatro famílias <i>HOX</i> apresentam expressão colinear, com genes 3' sendo expressos mais anteriormente que os genes 5'. Durante o desenvolvimento, os genes são expressos num padrão que correlaciona a expressão espacial, com genes 3' sendo expressos mais precocemente que os 5' (GRIER et al., 2005).....	32
Figura 4.1- Gel em agarose 2% do platô do TGIF	58
Figura 4.2 - Foto de gel de agarose 2% mostrando plasmídeo, sua linearização com diferentes enzimas e as sondas transcritas antes da digestão com Dnase I	62
Figura 5.1 - Exemplo de gel em agarose 2% mostrando não amplificação dos transcritos de gene <i>HOXC6</i> nos casos 3, 5, 7 e 8	68
Figura 5.2 - Cromatograma mostrando parte da seqüência dos transcritos do <i>HOXC6</i> amplificados por RT-PCR e enviados para sequenciamento	69
Figura 5.3 - Exemplo de gel em agarose 2% mostrando amplificação por RT-PCR de transcritos do <i>HOXA7</i> nos casos 6, 10, 11 e 14	70
Figura 5.4 - Parte do cromatograma obtido após sequenciamento do produto de RT-PCR, contendo parte do transcrito do <i>HOXA7</i>	71
Figura 5.5 - Exemplo de gel em agarose 2% mostrando amplificação de transcritos do <i>TGIF</i> nos casos 3, 4, 14, e 15.	76
Figura 5.6 - Parte do cromatograma obtido após sequenciamento do produto de RT-PCR contendo parte do transcrito do <i>TGIF</i>	76

Figura 5.7 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para os transcritos do *HOXA7* no tecido não tumoral adjacente. A, C e E imagens em HE correspondentes a B, D e F. (B) Epitélio exibindo sinal de ISH disperso por todas as camadas epiteliais exceto a camada de paraqueratina. (D) Epitélio mostrando sinal de ISH disperso porém mais proeminente nas camadas basal e suprabasal. (F) Epitélio exibindo sinal de ISH predominantemente nas camadas basal e suprabasal. (G) Sinal de ISH no citoplasma das células epiteliais. (H) Sonda sense, nenhum sinal foi observado. Aumento de 25X para todas as imagens exceto (G) com 100X.....82

Figura 5.8 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para transcritos do *TGIF* no tecido não tumoral adjacente. A, C e E imagens em HE correspondentes a B, D e F. (B) Epitélio exibindo sinal de ISH disperso por todas as camadas epiteliais exceto a camada de paraqueratina, notar que o sinal é mais intenso em algumas células. (D) Epitélio apresentando sinal de ISH disperso por todas as camadas, exceto a camada de paraqueratina sendo mais proeminente em área focal. (F) Epitélio exibindo sinal de ISH predominantemente nas camadas basal e suprabasal. (G) Sinal de ISH no citoplasma das células epiteliais. (H) Sonda sense, nenhum sinal foi observado. Aumento de 25X em todas as imagens exceto em (G) com 100X 83

Figura 5.9 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para os transcritos do *HOXA7* nos CEs de boca. A, C, E e G imagens em HE correspondentes a B, D, F e H respectivamente. (B) carcinoma bem diferenciado mostrando sinal de ISH variável nas células neoplásicas, ilhotas e cordões, mas ausente nas pérolas de queratina. (D) Detalhe de ilhotas tumorais em carcinoma bem diferenciado mostrando intenso sinal da ISH mas praticamente ausente nas células da peróla de queratina. (F) Sinal discreto de ISH nas ilhas de células neoplásicas de carcinoma moderadamente diferenciado. (H) Área de carcinoma pouco diferenciado com sinal de ISH bem proeminente no epitélio de superfície tornando-se muito discreto nas células neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente. Aumento de 25X em todas as imagens, exceto em C e D com aumento de 100X 84

Figura 5.10 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para transcritos do *TGIF* nos CEs de boca. A, C, E e G imagens em HE correspondentes a B, D, F e H respectivamente. (B) carcinoma bem diferenciado mostrando sinal de ISH variável nas células neoplásicas, ilhotas e cordões, mas ausente nas pérolas de queratina. (D) carcinoma moderadamente diferenciado exibindo sinal de ISH nas ilhas de células neoplásicas. (F) Sinal de ISH nos cordões de células neoplásicas de carcinoma menos diferenciado sendo mais evidente em células focais. (H) Área pouco diferenciada de CE de boca mostrando sinal de ISH proeminente no epitélio de superfície tornando-se muito discreto nas

células neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente.
Aumento de 25X em todas as imagens, exceto em E e F com aumento
de 100X.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Seqüência dos primers utilizados para a reação de RT-PCR.....	56
Tabela 4.2 - Concentrações dos reagentes utilizados para cada par de primers.	56
Tabela 4.3 - Condições de ciclagem para os diferentes iniciadores	57
Tabela 4.4 - Enzimas de restrição utilizadas para linearização dos plasmídeos e polimerase utilizada na transcrição da sonda	61
Tabela 5.1 - Distribuição amostral segundo as características demográficas e de hábito dos pacientes.....	66
Tabela 5.2 - Estatísticas descritivas da amostra segundo Idade do paciente, tamanho e espessura do tumor (cm)	66
Tabela 5.3 - Distribuição amostral segundo as características do tumor	67
Tabela 5.4 - Distribuição amostral segundo as características de invasão	67
Tabela 5.5 - Amplificação por RT-PCR do transcrito do gene <i>HOXA7</i> nos casos de carcinoma epidermóide e seus tecidos não tumorais adjacentes	70
Tabela 5.6 - Análise da concordância entre a presença de transcritos do <i>HOXA7</i> em TN e TU.....	72
Tabela 5.7 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>HOXA7</i> nas amostras TU e local da neoplasia	72
Tabela 5.8 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>HOXA7</i> nas amostras TU com estadiamento UICC	73
Tabela 5.9 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>HOXA7</i> nas amostras TU com o T(TNM)	73

Tabela 5.10 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>HOXA7</i> nas amostras TU com as metástases em linfonodos N(TNM).....	73
Tabela 5.11 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>HOXA7</i> nas amostras TU e a invasão vascular e neural.....	74
Tabela 5.12 - Comparações das médias do tamanho e espessura das neoplasias com relação à amplificação dos transcritos do <i>HOXA7</i> nas amostras TU	74
Tabela 5.13 - Amplificação dos transcritos do gene <i>TGIF</i> nos casos de carcinoma epidermóide e tecidos não tumorais adjacentes.....	75
Tabela 5.14 - Análise da concordância entre a presença dos transcritos do <i>TGIF</i> em TN e TU	77
Tabela 5.15 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>TGIF</i> nas amostras TU e o local da neoplasia	78
Tabela 5.16 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>TGIF</i> nas amostras TU com o estadiamento UICC	78
Tabela 5.17 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>TGIF</i> nas amostras TU com a extensão do tumor (TNM)	78
Tabela 5.18 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>TGIF</i> nas amostras TU com as metástases em linfonodos(TNM).....	79
Tabela 5.19 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do <i>TGIF</i> nas amostras TU e a invasão vascular e neural.....	79
Tabela 5.20 - Comparações das médias do tamanho e espessura das neoplasias com relação à amplificação dos transcritos do <i>TGIF</i> nas amostras TU	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
°C	graus Celsius
aa	aminoácidos
<i>Abd-B</i>	gene <i>Abdominal-B</i>
<i>Antp</i>	gene <i>Antennapedia</i>
<i>APC</i>	do inglês “adenomatous polyposis coli”
BMP-2	proteína morfogenética do osso 2
CE	carcinoma epidermóide
CDNA	do inglês “complementary desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico complementar
CRBP II	promotor II da proteína celular de ligação ao retinóide
<i>DCC</i>	do inglês “deleted in colon cancer”
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	do Inglês “desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico
DNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	do inglês “epithelial growth factor” ou fator de crescimento epitelial

EGFR	do inglês “epithelial growth factor receptor” ou receptor do fator de crescimento epitelial
ERK MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
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 <i>HOX</i> (homeobox agrupados)
HPV	do inglês “human papillomavirus”
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”
N-CAM	molécula de adesão neural
NCBI	do inglês “National Center for Biotechnology Information”
Ng	nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTX	do inglês “orthodenticle”

<i>PAX</i>	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
<i>PTEN</i>	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
RXRE	elemento responsivo específico a retinóides
TA	temperatura ambiente
TAE	tris-acetato EDTA
TALE	do inglês “three-amino acid loop extension”
TGF- α	do inglês “transforming growth factor alpha” ou fator de crescimento transformante alfa
TGF- β	do inglês “transforming growth factor beta” ou fator de crescimento transformante beta
<i>TGIF</i>	do inglês “TGF β -induced factor”
<i>TGM1</i>	gene da transglutaminase 1
T β R-II	receptor II do TGF- β
TN	tecido não tumoral adjacente
TNM	estadiamento TNM em que T= tumor; N= acometimento de linfonodos e M=metástases à distância

TU	tecido tumoral
UICC	do Francês “Union Internationale Contre Le Cancer”
UVB	raios ultra-violetas B

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 carcinoma epidermóide de Boca	23
2.1.1 carcinoma epidermóide de boca e a via do <i>TGF-β</i>	25
2.1.2 carcinoma epidermóide de boca e os retinóides	27
2.1.3 carcinoma epidermóide de boca e a via EGF/Ras/MAPcinas	28
2.2 genes homeobox	30
2.2.1 genes homeobox e ácido retinóico	34
2.2.2 genes homeobox e o câncer	35
2.3 HOXA7	37
2.4 HOXC6	42
2.5 TGIF	46
3 PROPOSIÇÃO	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Obtenção dos espécimes	52
4.2 Seguimento Clínico dos Pacientes	53
4.3 Obtenção do RNA	53
4.4 PCR	54
4.5 Subclonagem	58
4.6 Preparo da sonda	61

4.7 Híbridização “In Situ”	62
5 RESULTADOS	65
5.1 RT-PCR	67
5.1.1 <i>HOXC6</i>	68
5.1.2 <i>HOXA7</i>	69
5.1.3 <i>TGIF</i>	75
5.2 Híbridização In situ	80
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais freqüente em boca. Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico e nos tratamentos esta continua sendo uma neoplasia com altas taxas de morbidades e mortalidade. Este fato faz com que ocorra uma busca freqüente por informações que levem a melhor compreensão desta neoplasia.

Atualmente acredita-se que o entendimento do câncer possa se beneficiar dos conhecimentos sobre o desenvolvimento embrionário, já que ambos envolvem a regulação ou não da diferenciação, proliferação, e morte celular. Os genes homeobox são uma importante família de genes de desenvolvimento, que codificam para proteínas que atuam como fatores de transcrição e regulam diversos aspectos da morfogênese e diferenciação celular. Vários genes homeobox já foram identificados em neoplasias e parecem ter algum papel em diferentes tipos de câncer.

O projeto genoma câncer de cabeça e pescoço identificou 20 genes homeobox entre os quais estavam o *HOXA7*, *HOXC6* e o *TGIF*. Esses genes já foram observados em outras neoplasias, porém não existem dados referentes a carcinogênese de boca, assim propusemo-nos a analisar a presença de transcritos desses genes em carcinomas epidermóides de boca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermóide de Boca

O câncer de boca é uma das 10 neoplasias malignas mais freqüentes no mundo, com aproximadamente 75% de todos os casos ocorrendo em países em desenvolvimento (RODRIGUES; MOSS; TUOMAINEN, 1998). A Estimativa de Incidência de câncer para 2005 no Brasil aponta esta neoplasia como a 6ª mais freqüente entre os homens (com 9.985 casos estimados) e a 8ª entre as mulheres (com 3.895 casos estimados) (INCA, 2005). Dentre as neoplasias malignas que acometem a mucosa bucal, o carcinoma epidermóide (CE) é a mais freqüente e resulta da transformação maligna do epitélio de revestimento (CARPENTE; SILVERMAN, 2001).

O carcinoma epidermóide de boca acomete principalmente homens, a partir dos 40 anos de idade, com pico de incidência na sexta década de vida (CARPENTE; SILVERMAN, 2001, GERVÁSIO et al., 2001). Modificações nesse perfil têm sido observadas e CEs em indivíduos mais jovens vem sendo diagnosticados com maior freqüência nos últimos anos (SASAKI et al., 2005). As localizações preferenciais são a língua, lábio inferior e assoalho bucal podendo manifestar-se clinicamente como manchas brancas (leucoplasias), vermelhas (eritroplasias) e como lesões ulceradas, endurecidas ou infiltrativas (CARPENTE, SILVERMAN, 2001; GERVÁSIO et al., 2001). As metástases ocorrem principalmente nos linfonodos cervicais, pulmões, ossos e fígado. O estadiamento clínico e o padrão de invasão são considerados os

fatores prognósticos mais relevantes, ressaltando a importância do diagnóstico precoce (SASAKI et al., 2005, WOOLGAR 2005). Apesar dos avanços no controle da doença com o uso combinado de diversas terapias, a taxa de sobrevida de cinco anos não teve grande aumento nos últimos vinte anos. A busca por marcadores biológicos que possam prever o comportamento da doença e o risco de recorrências e metástases vem sendo um constante desafio para os pesquisadores (GINOS et al., 2004).

A etiologia do CE é muito variada, não existindo um único fator causador. O tabagismo e ou o alcoolismo são considerados os principais fatores de risco, sendo que para o câncer de lábio a exposição à radiação UV é o fator etiológico mais importante (CARPENTE, SILVERMAN, 2001; GERVÁSIO et al., 2001; WIGHT, OGDEN, 1998). O câncer é uma doença genética complexa, representada pelo crescimento descontrolado de um tipo celular em particular, que foi iniciada por mutação em um ou mais genes, e seguida de um acúmulo de alterações em centenas, se não milhares, de genes (BARTEK, LUKAS, 2001). Reconhece-se atualmente que as células neoplásicas exibem diferentes alterações genéticas como, mutações que ativam ou inativam genes, ampliações de regiões cromossômicas, deleções de partes de cromossomos, recombinações e translocações (MURRAY, HUNT, 1993). Para os cânceres do epitélio foi estimado que de quatro a sete eventos genéticos, pelo menos, são necessários para a transformação maligna (RENAN, 1993).

As alterações genéticas mais freqüentemente encontradas no CE de cabeça e pescoço são ganhos nos cromossomos 3q, 8q, 20q, 7p, 11q13 e 5p e perdas em 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q e 8p (JEON et al., 2004). Observam-se ainda perdas na região 6p, 7q, 7p, 8p, 10q, 11q, 22q (SCULLY, FIELD, TANZAWA, 2000). Nessas

regiões encontram-se genes sub ou super regulados que codificam para classes de proteínas funcionais específicas, como as reguladoras de ciclo celular, as envolvidas na diferenciação terminal dos queratinócitos, as supressoras de tumor e as moléculas de adesão (JEON et al., 2004).

Nos CEs de cabeça e pescoço, alterações em vias de sinalizações envolvendo receptores de fatores de crescimento, transdutores de sinais e fatores de transcrição que regulam a resposta ao dano do DNA, parada do ciclo celular e a morte celular programada ocorrem tão freqüentemente e produzem tantas alterações fenotípicas dramáticas que são consideradas os eventos críticos da transformação levando a doença à progressão (JEON et al., 2004).

Nesse sentido, o envolvimento de diversas vias de sinalização nos CEs de boca vem sendo discutidos tais como as vias onde estão presentes os genes *p53* (JONES, 1998; RIVERO, 2003), *APC* (adenomatous polyposis coli), (LARGEY MELTZER, SAUK, 1994; RIVERO, 2003), *DCC* (deleted in colon cancer), (KIN, LI, BERTOLAMI, 1993; RIVERO 2003), *PTEN* (SQUARIZE, CASTILHO, PINTO JR, 2002), *TGF- β* (JEON et al., 2004; PARTRIDGE et al., 1989), receptor do ácido retinóico, *EGFR* e *involucrina* (JEON et al., 2004) entre outros.

2.1.1 carcinoma epidermóide de boca e a via do *TGF- β*

A via de sinalização do *TGF- β* vem sendo amplamente estudada em diversas neoplasias inclusive em CE de boca. A *TGF- β 1* é um potente inibidor de crescimento para vários tipos celulares, inclusive queratinócitos, entretanto o papel do *TGF- β* na

neoplasia não está claro (PATERSON et al., 2001). Após a fosforilação dos receptores TGF- β , ocorre a ativação das proteínas Smads, levando a formação de complexos da Smad2 ou 3 com a Smad4, que seguem para o núcleo onde ativam os genes alvos (MURO-CACHO et al., 2001). A TGF- β pode agir tanto como supressora tumoral como estimuladora da progressão, invasão e metástase. Nos estágios iniciais da oncogênese ela atua inibindo o crescimento celular. Com a continuidade de processo, a TGF- β passa a estimular a progressão atuando tanto nas células neoplásicas como no estroma tumoral (AKHURST, DERYNCK, 2001; DUMONT, ARTEAGA, 2003; WAKERFILD, ROBERTS, 2002).

Em culturas de células de CEs de boca observou-se comportamento variável, com linhagens celulares mostrando-se resistentes à inibição do crescimento quando tratadas com TGF- β 1. Além disso, foi observada a perda do receptor II do TGF- β (T β R-II) (ICHIJO, MOMOSE, MIYAZONO, 1990). A redução da expressão do T β R-II também foi demonstrada pela imunistoquímica em tumores invasivos quando comparados ao epitélio de superfície e em metástases quando comparadas aos tumores primários. A expressão das isoformas TGF- β 1 TGF- β 2 e TGF- β 3 foi verificada e não apresentou diferenças significativas (PATERSON et al., 2001). Diferentemente, Logullo et al. (2003), através de imunistoquímica verificaram que a maioria dos casos de CEs de cabeça e pescoço analisados eram negativos para TGF- β 1, enquanto os tecidos adjacentes continuavam com expressão normal. Não foi possível estabelecer correlação entre a expressão dessa proteína e os parâmetros clínicos e histopatológicos. Por outro lado, a produção de TGF- β 1 por células neoplásicas de CEs de boca foi demonstrada e relacionada com a invasão tumoral dessa neoplasia, tanto aumentando a motilidade celular como induzindo o estroma adjacente (HASSINA et al., 1999; LEWIS et al., 2004).

Muro-Cacho et al (2001), observaram a perda da expressão de Smad2 em 38% dos casos de CE de cabeça e pescoço estudados, sendo que nos casos menos diferenciados esse evento era mais freqüente. Segundo os autores esse fator pode explicar a resistência à inibição do crescimento em neoplasias em que expressão T β R-II é mantida.

2.1.2 carcinoma epidermóide de boca e os retinóides

Outras moléculas envolvidas com a carcinogênese de boca são os retinóides. Os retinóides são compostos derivados da vitamina A (retinol), que é necessária na diferenciação normal das células epiteliais. O crescimento e a diferenciação *in vitro* de células normais e malignas foram modulados pelos retinóides, em decorrência do seu efeito na expressão de outros genes (GUDAS, 1992). Os retinóides induzem apoptose, levando à maturação normal das células em divisão, e assim suprimindo a carcinogênese, e também diminuem a taxa de crescimento das células epiteliais (AMOS, LOTAN, 1991).

Foi mostrado que a isotretinoína pode prevenir o desenvolvimento de CEs segundo primários (BENNER et al., 1994), e pode ser utilizada na quimioprevenção de lesões cancerizáveis de boca (GORSKY, EPSTEIN, 2002). Entre as lesões cancerizáveis de boca a mais comum é a leucoplasia, e o potencial de transformação maligna é mais alto para aquelas que apresentam atipia celular, tendo sido descrito nesses casos um índice de transformação de até 43% (PINDBORG et al., 1968), embora índices ao redor de 17,5% sejam mais aceitos (SILVERMAN,

GORSKY, LOZADA, 1984). Os retinóides também têm se mostrado efetivos em reverter essas lesões.

Além disso, a expressão do receptor β do ácido retinóico parece estar ausente ou subregulada em CEs de boca. Foi demonstrado ainda que a superexpressão desse receptor possa estar envolvida na parada do ciclo celular e na apoptose de linhagens celulares de CEs de boca (HAYASHI et al., 2001)

2.1.3 carcinoma epidermóide de boca e a via EGF/Ras/MAPcinases

Outra via de sinalização em que se observam alterações na carcinogênese de boca e tem sido alvo de estudos, é a via ERK MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno). Esta via de sinalização é muito importante para proliferação celular. As ERK MAPKs estão localizadas a jusante na via de sinalização de inúmeros fatores de crescimento, como o EGF (fator de crescimento epidérmico) e oncoproteínas como a RAS. Esta via foi associada à proliferação de CEs de boca assim como do epitélio normal, entretanto estando mais ativada nas neoplasias. A super expressão de ERK MAPK é observada em vários tipos de câncer incluindo CEs de boca (MISHIMA, IMOUE, HAYASHI, 2002). Em CEs de cabeça e pescoço uma expressão nuclear de ERK1/2 é correlacionada com metástases para linfonodos e é visualizada predominantemente nas margens invasivas da neoplasia, sendo correlacionada com a expressão do EGF-R (receptor do EGF) (RICHTER et al., 2005). A super expressão do próprio EGF-R já foi demonstrada nessa neoplasia (MISHIMA, IMOUE, HAYASHI, 2002; RICHTER et al., 2005) por vezes sendo relacionada com o menor

grau de diferenciação (CHRISTENSEN et al., 1992). Por outro lado à diminuição do EGF-R em CEs de boca também já foi observada (SAKAI et al., 1990). Além do envolvimento das cinases e do EGF-R, mutações e superexpressão do Ras são observadas em 30% dos CEs de boca no sudeste asiático, que são associados ao hábito de mascar tabaco, porém esses eventos são raros nas outras populações nas quais o envolvimento de outras moléculas da via de sinalização é mais relevante (MISHIMA, IMOUE, HAYASHI, 2002).

Desde a descrição de que o oncogene *Ras* desempenha um papel na determinação do destino celular, acredita-se que o entendimento do câncer pode se beneficiar dos conhecimentos sobre desenvolvimento embrionário (ARIAS, 2001; EGAN, WEINBERG, 1993). Diferentes autores costumam considerar que a similaridade de moléculas envolvidas no desenvolvimento embrionário e no câncer é uma consequência do fato de serem esses processos dois lados da mesma moeda. De um lado o câncer sendo o resultado da regulação inadequada de genes que controlam a diferenciação, proliferação e morte celular, e do outro lado esses mesmos processos que atuam de forma equilibrada durante o desenvolvimento. Dentre os genes de desenvolvimento que estão sendo muito estudados em neoplasias estão os homeobox (NUNES, MATIZONKAS-ANTONIO 2005). Esta família de genes foi estudada no presente trabalho e será abordada separadamente.

2.2 Genes Homeobox

Os genes homeobox são considerados importantes no controle do desenvolvimento embrionário, atuando no topo de hierarquias genéticas, regulando aspectos da morfogênese e da diferenciação celular (MARK, RIJLI, CHAMBON, 1997). Eles foram descobertos na mosca da fruta, a *Drosófila*, sendo identificados como genes que, quando mutados provocam a homeose ou a mudança de identidade de um segmento corporal. Na *Drosófila* a mutação em um desses genes (*Antennapedia*) provoca a formação de pernas no lugar das antenas (HOMBRIA, LOVEGROVE, 2003). Os homeobox foram subseqüentemente isolados em diferentes animais, plantas e fungos (CILLO et al., 1999).

Os genes homeobox são uma família de genes reguladores, os quais contêm uma seqüência comum de 183pb (homeobox) e codificam para proteínas nucleares específicas (homeoproteínas) que atuam como fatores de transcrição. A homeobox codifica para uma seqüência de 61 aminoácidos denominada de homeodomínio que é responsável pelo reconhecimento e ligação à seqüências específicas de DNA (CILLO et al., 1999; FORD, 1998). Análises estruturais revelaram que o homeodomínio consiste num motivo hélice-alça-hélice que se liga ao DNA através da inserção da hélice de reconhecimento no sulco maior do DNA e do seu braço N-terminal no sulco menor adjacente (GEHRING et al., 1990). O braço N-terminal modula a afinidade das proteínas homeobox em se ligarem ao DNA contribuindo para interações seletivas com diferentes alvos das proteínas homeobox (PELLERIN et al., 1994). A especificidade dessas ligações permite que as homeoproteínas ativem ou reprimam a expressão dos genes alvo (CILLO et al., 1999, 2001). Os

genes alvo das proteínas homeobox de mamíferos ainda não são bem conhecidos. Sabe-se que eles incluem genes que codificam para proteínas da matriz extracelular, moléculas de adesão e fatores de crescimento (FORD, 1998).

Os homeobox são separados em famílias, sendo que no genoma humano estima-se que existam ao menos 200 deles (ABATE-SHEN, 2002). Os homeobox podem ser divididos em duas subfamílias: os homeobox agrupados conhecidos como genes *HOX* e os homeobox não agrupados ou divergentes, os quais estão espalhados pelo genoma e formam grupos baseados em similaridades nas seqüências (MARK, RIJLI, CHAMBON, 1997).

Em humanos existem 39 genes *HOX*, os quais estão organizados em quatro grupos; *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*, cada um localizado em um cromossomo, respectivamente 7p15, 17p21, 12q13 e 2q31. Cada grupo possui de 9 a 11 genes que formam ainda 13 grupos parálogos. Estes genes apresentam alto grau de identidade de seqüência aos seus homólogos genes *HOM-C* em *Drosophila*, sendo os genes de 1 a 8 relacionados ao gene *Antennapedia* (*Antp*) e os genes de 9 a 13 relacionados ao gene *Abdominal-B* (*Abd-B*). Durante o desenvolvimento embrionário, os genes *HOX* determinam a identidade posicional ao longo dos eixos antero-posterior, sendo expressos seqüencialmente de 3' para 5', com genes de número menor (Ex. *HOXA1*) expressos mais cedo e mais anteriormente que os genes de número maior (Ex. *HOXA13*). Tanto na *Drosófila* como em humanos, o padrão espacial de expressão, correspondente à posição no cromossomo é denominado de princípio da colinearidade (Figura 2.1) (CHARIOT et al., 1996; CILLO et al., 1999, 2001; GRIER et al., 2005). Nos embriões de mamíferos, os genes *HOX* começam a ser expressos durante a gastrulação. Eles controlam coletivamente a

identidade de várias regiões ao longo do eixo corpóreo, desde a região braquial até a caudal (CILLO et al., 1999; MARK, RIJLI, CHAMBON, 1997).

Figura 2.1 - (A) Transformação homeótica na drosófila. Na mutação Antennapedia, as antenas foram transformadas em patas, enquanto que na mutação Bithorax, os balanceadores são transformados em asas. (B) Conservação das famílias HOM-C e HOX. A sequência é conservada em nível de cromossomos e nucleotídeos. Em humanos, as quatro famílias HOX apresentam expressão colinear, com genes 3' sendo expressos mais anteriormente que os genes 5'. Durante o desenvolvimento, os genes são expressos num padrão que correlaciona a expressão espacial, com genes 3' sendo expressos mais precocemente que os 5' (modificado de GRIER et al., 2005)

Mutações nos genes *HOM-C* geralmente resultam em transformações homeóticas em segmentos anteriores ao que o gene é expresso. Mutações com perda de função usualmente levam ao desenvolvimento de estruturas normalmente encontradas em segmentos mais anteriores, enquanto que mutações com ganho de função resultam em segmentos com aparência e estrutura associadas aos segmentos posteriores. Esse efeito é chamado de “dominância posterior” ou “prevalência posterior” e é o resultado do padrão de expressão sobreposto dos genes *HOM-C* com os genes posteriores 5’ inibindo os efeitos dos genes anteriores 3’ (CILLO et al., 2001; GRIER et al., 2005; MARK, RIJLI, CHAMBON, 1997).

A ação das proteínas *HOX* resulta muito mais da combinação da expressão de diversos genes *HOX* do que da atividade de apenas um dominante. Na célula, interações entre genes *HOX* com outros homeobox e ou genes externos reguladores ou efetores, já foram documentadas (CHARIOT et al., 1996; CILLO et al., 2001).

A maioria dos genes homeobox não pertence ao grupo *HOX* e não estão envolvidos em transformações homeóticas. Eles foram classificados como homeobox não agrupados, e divididos num grande número de famílias baseadas na similaridade das seqüências de seus respectivos homeodomínios e de domínios protéicos adicionais (GRIER et al., 2005). Essas famílias, como por exemplo, *PAX*, *EMX*, *OTX* e *MSX* foram nomeadas de acordo com seus homólogos na *Drosófila*, *paired*, *empty spiracles*, *orthodenticle* and *muscle segment homeobox genes* respectivamente (CILLO et al., 1999; MARK, RIJLI, CHAMBON, 1997).

Os produtos dos genes homeobox não agrupados funcionam geralmente como co-fatores das proteínas *HOX*. Entre eles estão as proteínas **TALE** (**T**hree-**A**minoacid **L**oop **E**xtension), *PBX* e *MEIS*, que se ligam às seqüências de aminoácidos do homeodomínio e são altamente expressas em tecidos fetais e

adultos. Enquanto as proteínas PBX interagem preferencialmente com proteínas HOX em 3', homólogas a Antp, as proteínas MEIS interagem principalmente com as proteínas HOX em 5' (CHARIOT et al., 1996; GRIER et al., 2005).

Os genes homeobox são bons exemplos de conservação dos genes de desenvolvimento no reino animal. Os genes *HOX* têm sido utilizados para monitorar a evolução genômica. A comparação dos genes através da similaridade entre suas seqüências tem se mostrado como uma estratégia útil para os estudos de mecanismos de desenvolvimento (GRIER et al., 2005).

2.2.1 genes homeobox e ácido retinóico

Diferentes estudos têm mostrado que os homeobox, principalmente os genes *HOX* parecem estar sob o controle do ácido retinóico (AR). A ação do AR é obtida através da ligação com receptores específicos, que fazem parte da superfamília de receptores nucleares. Existem dois tipos: o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor de retinóide X (RXR). Os RAR e RXR atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, modulando a expressão dos genes responsivos ao AR. Os heterodímeros RXR/RAR fazem ligações de alta afinidade com seqüências específicas de DNA conhecidas como elementos responsivos ao AR (RARE) (MINUCCI, OZATO, 1996). Durante a embriogênese, os genes alvo da sinalização pelos retinóides são capazes de responder diferentemente a concentrações idênticas de retinóides. Pequenas diferenças nos RAREs podem ser essenciais para essas respostas diferentes (NIEDERREITHER et al., 2001). Estudos mostraram que

o gene *Hoxa-1* possui uma seqüência RARE dentro de uma seqüência estimuladora que o flankeia em 3'. Já o gene *Hoxd-4* possui seqüências RARE nas regiões 5' e 3'. Esses achados já foram descritos para outros genes homeobox principalmente dos grupos *HOXA* e *HOXB* (LANGSTON, THOMPSON, GUDAS, 1997; MARSHALL et al., 1996). Foi demonstrado que mutação na seqüência RARE dos homeobox interfere com sua função durante a embriogênese, e também que o AR regula a expressão desses genes através dessas seqüências durante o desenvolvimento de vários órgãos. Essa regulação é uma das bases para a ação teratogênica dessas substâncias (ROSS et al., 2000).

2.2.2 genes homeobox e o câncer

Estudos sugerem que certos genes homeobox podem promover uma importante ligação entre processos envolvidos no controle do ciclo celular, desenvolvimento e câncer (ABATE-SHEN, 2002, CILLO et al., 1999, 2001).

Durante as últimas décadas, vários genes homeobox, agrupados e não agrupados, foram identificados em tecidos normais, em células malignas e associados a diferentes doenças e condições metabólicas (CILLO et al., 2001). Os homeobox estão envolvidos, por exemplo, no desenvolvimento normal do dente e em agenesias dentárias de ocorrência familiar (CALDAS, APARÍCIO, 1999).

A literatura tem mostrado um número cada vez maior de trabalhos relacionando os genes homeobox a oncogênese (GRIER et al., 2005; NUNES et al., 2003). Em tumores primários de rim, os genes homeobox podem estar desligados ou

ligados, e apresentar transcritos de tamanho variado (CILLO et al., 1992). Na leucemia, níveis elevados de expressão de genes *HOX* têm sido freqüentemente observados, especialmente na leucemia mielóide aguda (KAWAGOE et al., 1999). Pesquisas recentes sobre a expressão de genes *HOX* na leucemia têm fornecido critérios importantes para a classificação da doença e a previsão do comportamento clínico (GRIER et al., 2005). Outros cânceres onde a participação de genes homeobox tem sido mencionada são câncer de mama (RAMAN et al., 2000), de cólon e reto (VIDER et al., 1997), melanoma (CILLO et al., 1996), entre outros (GRIER et al., 2005). Chen et al. (2005) encontraram oito dos 39 *HOX* exclusivamente expressos no carcinoma epidermóide de esôfago, e outros cinco presentes também no epitélio não tumoral.

Segundo Abate-Shen (2002) a desregulação da expressão dos genes homeobox nas diferentes neoplasias pode ser classificada em três tipos: os genes homeobox podem estar re-expressos em células neoplásicas derivadas de células que os expressam durante o desenvolvimento; podem estar expressos em células que normalmente não os expressam durante o desenvolvimento; ou ainda estarem subregulados em células neoplásicas que se originaram de tecidos em que o gene homeobox está normalmente expresso. Para a autora, a perda ou ganho de expressão dos genes homeobox promove a oncogênese como uma consequência dos seus efeitos inapropriados no crescimento e diferenciação e ainda, esses genes atuariam mais como moduladores do que como supressores de tumor ou oncogenes. Considera também que estudos sobre a participação dos homeobox em neoplasias específicas podem ser muito importantes no entendimento do fenótipo do câncer.

Com relação ao CE de boca existe apenas um trabalho na literatura internacional correlacionando a expressão de um gene homeobox, o *Quox-1* com essa neoplasia (ZHU et al., 2004). Os autores verificaram a expressão do gene em epitélio com atipia e em carcinoma epidermóide, enquanto que a proteína estava ausente no epitélio normal adjacente. Foi observado que a expressão era mais intensa conforme aumentava o grau de atipia.

Em estudos anteriores, verificamos em carcinomas epidermóides de boca a expressão dos genes homeobox *PITX1* (LIBÓRIO, 2004), *HOXB5* (TUCCI, 2003; ALMEIDA, 2004), *HOXB13* e *HHEX* (CAZAL, 2004) utilizando-se RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) e hibridização in situ. Esses genes foram inicialmente identificados no projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço (REIS et al., 2005), juntamente com outros homeobox, incluindo os genes *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* os quais foram alvos desse estudo e por isso serão abordados separadamente.

2.3 HOXA7

O gene *HOXA7* pertence à família dos homeobox agrupados, *HOXA*, estando localizado no cromossomo 7p15-p14. Este gene é muito similar ao gene Antennapedia (*Antp*) da *Drosófila* e codifica para uma proteína de 230 aa (NCBI. LocusLink *HOXA7*, 2004).

Os genes alvo e as funções da *HOXA7* ainda são pouco conhecidos. Dentre as regiões protéicas que podem ser encontradas fora do homeodomínio da *HOXA7*,

podemos citar um motivo hexapeptídio adjacente ao homeodomínio, uma seqüência N-terminal conservada e uma extensão de resíduos de ácido glutâmico na região C-terminal, que é uma característica de algumas proteínas HOX. Entre o hexapeptídio e a região N-terminal, a HOXA7 apresenta uma região que é única. Essa região contém uma alta porcentagem de resíduos de prolina e alanina, os quais são freqüentemente associados com domínios reguladores de transcrição. A HOXA7 funciona como um potente repressor de transcrição, sendo que essa função requer a atuação dos vários domínios, incluindo regiões ativadoras e repressoras. Os domínios podem ser diferencialmente utilizados dependendo do ambiente celular e do contexto da ativação do promotor. A complexidade da atuação da HOXA7 é demonstrada pela presença de um domínio de ativação, que sugere que em certas situações a HOXA7 pode ativar, mais do que reprimir, a transcrição. Já que está bem estabelecido que a repressão transcripcional é crucial para manter as células num estado indiferenciado durante períodos de rápida proliferação, pode-se sugerir que uma alteração no gene *HOXA7* e conseqüentemente a perda da função repressora de sua proteína, pode resultar em diferenciação prematura de células precursoras mais do que em proliferação celular anormal (SCHNABEL, ABATE-SHEN, 1996).

O homeodomínio e o motivo hexapeptídeo da HOXA7 humana e da do camundongo são idênticos, apesar de algumas divergências na seqüência do ácido nucléico. As proteínas exibem uma total semelhança incluindo o domínio C-terminal (CELLE, POLAKOWSKA, 2001).

Dentre as funções conhecidas da HOXA7, está a inibição de genes específicos de diferenciação durante a proliferação de queratinócitos. Celle e Polakowska (2001) demonstraram que a expressão dos genes *HOXA7*, *HOXA5* e

possivelmente do *HOXB7* está sub-regulada através da diferenciação induzida por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) em cultura de queratinócito. A sub-regulação de *HOXA7* também foi observada através da diferenciação mediada pelo contato célula–célula ou através do aumento de concentração extracelular de cálcio. Além disso, a expressão de *HOXA7* antisense estimulou genes associados à diferenciação como *TGM1* (gene da transglutaminase 1), *involucrina*, e *queratinas 1* e *10*, diminuindo o crescimento. Os autores afirmam ainda que a proteína *HOXA7* liga-se ao fragmento de DNA regulatório do gene *TGM1* resultando numa repressão do promotor do *TGM1* em queratinócitos humanos normais. Contrariamente, em células de carcinoma ME180 que exibem alto nível de expressão do *TGM1* e crescimento anormal, a *HOXA7* estimulou o *TGM1*, o que mostra o potencial de *HOXA7* de atuar com ativador transcripcional dependente do contexto. Os autores sugerem que a linhagem ME180 possa expressar constitutivamente um cofator da *HOXA7* que levaria a ativação transcripcional de *TGM1* ou mascararia o domínio inibitório da *HOXA7*. Os autores observaram ainda que a ativação de receptores para EGF (fator de crescimento epidérmico) estimula a expressão de *HOXA7*, diminuindo a diferenciação e favorecendo a proliferação de queratinócitos.

A expressão do *HOXA7* em queratinócitos já havia sido demonstrada por outros autores, embora sua função não seja esclarecida. Stelnicki et al. (1998) verificaram a expressão dos genes *HOX* durante o desenvolvimento da derme e epiderme de humanos. Utilizando RT-PCR observaram expressão predominante de *HOXA7*, juntamente com *HOXA4* e *HOXA5* na pele de fetos e de neonatos. Esse padrão também foi identificado em tecidos adultos com a presença de alguns membros do grupo B. Utilizando a hibridização in situ, observaram um padrão espacial e temporal na expressão do *HOXA4*, *HOXA5* e *HOXA7* na epiderme

durante o desenvolvimento. A expressão parece se iniciar nas células basais, se espalhar por todas as camadas, exceto a camada córnea, depois ser menos prevalente na camada basal, mas ainda detectada na suprabasal. Nas amostras de neonatos e adultos a expressão foi detectada nas camadas mais superficiais (camada granulosa). Na derme a expressão foi bem discreta e somente observada nos fetos. Os folículos pilosos de recém-nascidos exibiam a expressão de *HOXA7*.

Em relação à expressão do *HOXA7* em neoplasias relacionadas aos queratinócitos Chang et al. (1998), verificaram a expressão diferencial de genes *HOX* em vários estágios da carcinogênese em pele de camundongos. Através de RT-PCR foi verificada em pele normal de camundongo adulto a expressão de 25 dos 39 genes *hox*, sendo que o *hoxa7* era o mais abundante. Nos carcinomas e papilomas essa presença era ainda mais marcante, o *hoxa7* e o *hoxb7* representavam mais de 60% dos genes detectados. Apesar disso, análises preliminares com “Northern blot” não mostraram superexpressão de *hoxa7* nessas neoplasias, quando comparadas à pele normal, sugerindo que a expressão desse gene possa estar sub-regulada nas células transformadas. Os autores sugerem que a alteração do controle regulatório dos genes *hox*, tanto através de sub-regulação como por expressão alterada nos tecidos pode liberar células inicialmente inibidas para proliferarem livremente e eventualmente adquirirem fenótipos malignos.

Em CEs humanos a expressão de *HOXA7* foi verificada através de RT-PCR em casos de esôfago. O padrão de expressão dos 39 genes *HOX* foi avaliado sendo observado alteração em 11 deles. Os transcritos do *HOXA7* estavam presentes em tecidos neoplásicos e em amostras de mucosa normal adjacente, porém a expressão era significativamente maior nas amostras neoplásicas. Foi sugerido que

a expressão alterada de genes *HOX* no câncer pode estar associada à progressão tumoral (CHEN et al., 2005).

A expressão do *HOXA7* já foi observada em outras neoplasias e tecidos normais de adultos. Em leucemias a participação e a expressão do *HOXA7* já foram verificadas por diversos autores, tendo inclusive implicações prognósticas (AFONJA et al., 2000; CALVO et al., 2002; KAWAGOE, KAWAGOE, SANO, 2001). Em tecidos normais, Takahashi et al. (2004) através de RT-PCR em tempo real verificou a expressão dos genes *HOX* e identificou *HOXA7* em cDNAs provenientes de pulmão, intestino, placenta, timo, glândula adrenal, próstata, tireóide, coração, intestino, testículo, músculo esquelético, rim, traquéia, útero, baço e medula óssea. Os transcritos de *HOXA7* estavam ausentes no cérebro, no cerebelo, na glândula salivar e no fígado.

Kloen et al (1997) verificaram através de RT-PCR a expressão de *HOXA7* em linhagem celular de osteossarcoma, enquanto que na linhagem de osteoblastos este transcrito estava ausente.

Calvo et al. (2000) verificaram a expressão de genes *HOX* em linhagens celulares de câncer de pulmão. A expressão de *HOXA7* foi observada em correlação com *HOXA10* e *HOXA9*. Linhagens que superexpressavam a *HOXA7* exibiram também a expressão do FGF10 (fator de crescimento fibroblástico 10) sendo sugerido que a superexpressão de genes *HOX* pode estar associada à indução dos genes FGF.

Naora et al. (2001) mostraram que o *HOXA7* está expresso em tumores de ovário exibindo diferenciação mulleriana. Utilizando a técnica de RT-PCR, observaram uma expressão significativa de *HOXA7* restrita a células epiteliais de carcinomas de ovário moderadamente e bem diferenciados, e em cistoadenomas,

enquanto que a expressão desse gene quase não foi detectada nas neoplasias pouco diferenciadas e no epitélio de superfície de ovários normais. A transfecção de HOXA7 em uma linhagem celular demonstrou a indução de E-caderina e inibição da expressão de vimentina, sendo sugerido pelos autores que o gene da E-caderina pode ser um possível alvo da HOXA7, e que a HOXA7 poderia promover um fenótipo epitelial nas células.

2.4 HOXC6

O gene *HOXC6* pertence à família dos homeobox agrupados, *HOXC*, estando localizado no cromossomo 12q13.3. Três genes, *HOXC5*, *HOXC4* e *HOXC6* são co-transcritos a partir de um transcrito primário. Processos subseqüentes resultam em transcritos gênicos específicos, que às vezes apresentam um exon não codificante na região 5' (NCBI. LocusLink *HOXC6*, 2004).

A organização genômica e expressão do gene *HOXC6* vêm sendo investigadas em algumas espécies, incluindo *Xenopus*, camundongos e humanos. Aparentemente esse membro da família *HOX* apresenta duas regiões promotoras denominadas PRI e PRII distantes 9Kb. O uso diferencial de ambos promotores resulta na síntese de dois transcritos que codificam para duas diferentes isoformas. A isoforma 1 é maior com 235 aa e a isoforma 2 exibe a região N-terminal menor que a isoforma 1, apresentando 153 aa (CHARIOT et al., 1996; CHARIOT, GIELEN, 1998; JONES et al., 1993). Entretanto, ambos os produtos carregam a mesma seqüência de 61 aa (denominado homeodomínio) que é responsável pela ligação ao

DNA, assim como um idêntico pentapeptídeo definido como uma pequena seqüência que está localizada a montante do homeodomínio e é necessária para a interação dos produtos de genes *HOX* com outras proteínas como, por exemplo, a Pbx. Esses produtos gênicos foram altamente conservados durante a evolução, sendo que a proteína HOXC6 longa humana e a do camundongo são 99% similares, e exibem a seqüência homeodominio idênticas (CHARIOT, GIELEN, 1998).

Estudos iniciais têm demonstrado que ambos os transcritos do HOXC6 em *Xenopus* ativam a transcrição, enquanto que em humanos os transcritos possuem habilidades intrínsecas de repressão (CHARIOT et al., 1996). Essas observações sugerem que as propriedades de transcrição da HOXC6 dependem do contexto celular e podem ser mediadas por interações DNA-proteína assim como interações proteína-proteína estabelecidas com outras proteínas contendo homeodomínio, criando um “efeito combinatório”. A existência desse efeito é sustentada pela sobreposição de domínios de expressão dessas proteínas ao longo do eixo ântero-posterior do embrião, demonstrando assim que múltiplos produtos são expressos numa única célula e provavelmente competem por sítios de ligação. Além desse efeito combinatório, as proteínas HOXC6 podem ainda estabelecer interações com co-fatores ainda desconhecidos (CHARIOT, GIELEN, 1998).

O *HOXC6*, assim como outros membros da família *HOX*, tem importante papel na especificação posicional durante o desenvolvimento embrionário de várias espécies (CHARIOT, GIELEN, 1998). As proteínas HOXC6 são fatores de transcrição que modulam a expressão de diversos genes alvo como, por exemplo, o gene que codifica a molécula de adesão neural (N-CAM) em *Xenopus*. Os produtos do *HOXC6* ligam-se a sítios de ligação específicos para homeodominio no promotor de N-CAM ativando-o, sendo que a ação combinatória das duas variantes tem efeito

sinérgico na transativação desse promotor. Durante o desenvolvimento de vertebrados, as duas proteínas HOXC6 são expressas no tubo neural, com diferentes padrões, no mesmo momento em que a N-CAM também está expressa. A N-CAM e outras moléculas de adesão e seus substratos modulam eventos na superfície celular, respostas celulares e diferenciação celular através da adesão, um mecanismo que tem muitas implicações tanto no desenvolvimento embrionário como na carcinogênese (JONES et al., 1993).

Funções adicionais para as proteínas HOXC6 na diferenciação celular vêm sendo demonstradas através de trabalhos que estudam a expressão do *HOXC6* numa variedade de tecidos adultos (CHARIOT, GIELEN, 1998; TAKAHASHI et al., 2004).

Chariot et al. (1996) verificaram que ambas as proteínas HOXC6 podem contribuir para o fenótipo de células mamárias através da repressão de seus genes alvos. Através de RT-PCR e Northern-Blot observaram expressão dos transcritos do HOXC6 em linhagens e em biópsias de carcinomas de mama, sendo que a expressão não estava necessariamente associada com a expressão em tecidos adjacentes. Foi mostrada ainda a expressão de *HOXC6* em linhagens celulares de ovário, carcinoma de ovário, e em linhagens celulares de câncer de cólon. Tibério et al. (1994) através da técnica de Northern-Blotting observaram a expressão do *HOXC6* em mais da metade dos cânceres de pulmão de pequenas células transplantados em camundongos atímico.

Takahashi et al. (2004) através da técnica RT-PCR em tempo real demonstrou a expressão de genes *HOX* em tecidos normais. O *HOXC6* foi encontrado no cérebro, pulmão, intestino, placenta, timo, glândula adrenal, próstata, testículo, glândula tireóide, rim, músculo esquelético, traquéia, baço, útero e medula

óssea. Esse gene não estava expresso do cerebelo, glândula salivar, fígado e nem nas linhagens de câncer de tireóide.

Em CEs de esôfago foi investigada a expressão dos 39 genes *HOX* e assim como para o *HOXA7*, foi observada superexpressão do *HOXC6* nas neoplasias quando comparadas aos tecidos normais adjacentes (CHEN et al., 2005).

O envolvimento do *HOXC6* no câncer de próstata foi demonstrado por Miller et al. (2003). Utilizando RT-PCR foi detectada superexpressão desse gene em linhagens celulares de câncer de próstata bem como nas metástases em linfonodos. Utilizando a técnica de captura a laser de células epiteliais malignas e normais, observaram expressão aumentada do *HOXC6* nas células tumorais. Ramachandram et al. (2005), utilizando microarrays verificaram expressão aumentada de 55 genes, entre eles o *HOXC6*, em carcinomas de próstatas quando comparados a tecidos de próstata normal. Esses resultados foram confirmados com PCR quantitativo em tempo real e em nível de proteína utilizando-se anticorpos policlonais específicos anti-*HOXC6* em lisados de células epiteliais de próstata normal e neoplásica. Além disso, através de ensaios com transfecção foi verificado que a inibição da expressão de *HOXC6* nas células neoplásicas de próstata leva as mesmas a apoptose e que os genes alvos da *HOXC6* poderiam estar envolvidos na via de sinalização do receptor de andrógeno.

Kloen et al. (1997), utilizando RT-PCR observaram a expressão do *HOXC6* em cultura de células de osteossarcoma e neuroblastoma, e identificaram diferentes efeitos de membros da família TGF- β (activina A, TGF- β 1 e BMP-2) na expressão desse gene nessas células. A expressão foi diminuída, ou não alterada, quando as células foram tratadas com BMP-2 e activina A, enquanto que a expressão foi aumentada pelo TGF- β 1. Boersma et al. (1999) mostraram que os níveis de

expressão do *HOXC6* em cultura de células osteoblásticas de camundongo diminuía em resposta a exposição à proteína BMP-2. Demonstraram ainda que a atividade do promotor de N-CAM e os níveis dessa proteína também diminuía na presença de BMP-2, mas que essa regulação era dependente dos níveis de *HOXC6* na célula, pois em células que superexpressavam *HOXC6*, a expressão de N-CAM não era alterada. Esses fatos sugerem um papel desse gene *HOX* na via de sinalização desses fatores de crescimento, bem como a possibilidade de o gene *HOXC6* ser alvo na via de membros da família TGF- β .

Moléculas de adesão como a N-CAM estão envolvidas na proliferação dos linfomas e leucemias. A expressão do gene *HOXC6* já foi relacionada à leucemia por Bijl et al. (1996). Estes autores através de RT-PCR e hibridização in situ, observaram a expressão desse gene durante a maturação de células linfóides B e T, linhagens de células mielóides e eritróides e em leucemias e linfomas não-Hodgkin. Reforçando achados anteriores, Bijl et al. (1997) observaram através de RT-PCR e hibridização in situ, a expressão de *HOXC6* em 77 de 88 casos de linfomas não-Hodgkin estudados.

A expressão anormal dos transcritos de *HOXC6* em neoplasias sugere que eles podem estar participando do processo de carcinogênese em diferentes tecidos.

2.5 *TGIF*

O gene *TGIF* (TGF β -induced factor) pertence à família dos homeobox não agrupados, estando localizado no cromossomo 18p11.3. A proteína codificada por

este gene pertence a superclasse de homeodomínios atípicos denominada TALE (“three-amino acid loop extension”), que apresentam a inserção de três aminoácidos entre as hélices 1 e 2 do homeodomínio (BERTOLINO et al., 1995). Foi demonstrada montagem (“splicing”) alternativa nesse locus e oito variantes que codificam para quatro isoformas já foram descritas. As isoformas são denominadas a, b, c e d, e apresentam respectivamente 401 aa, 286 aa, 272 aa e 252 aa sendo codificadas por diferentes variantes (NCBI. Locuslink TGIF, 2004).

Mutações no gene *TGIF* estão associadas com a holoprosencefalia, uma anomalia estrutural do cérebro com penetrância e fenótipo variáveis, que exibem desde sérios defeitos físicos até indivíduos normais. A mutação no *TGIF* foi encontrada em um único alelo, indicando que o fenótipo da holoprosencefalia é causado por uma insuficiência haplóide do produto gênico. Este fato sugere que a súbita mudança na concentração de TGIF pode levar a dramáticos efeitos durante o desenvolvimento (CHEN et al., 2003; GRIPP al., 2000).

A TGIF parece atuar em várias vias de regulação transcricional, como um repressor ligado ao DNA ou como um co-repressor em associação a outras proteínas ligantes ao DNA (WOTTON et al., 2001). A TGIF foi inicialmente identificada pela sua habilidade em ligar-se ao elemento responsivo específico a retinóides (RXRE), localizado no promotor II da proteína celular de ligação ao retinóide (CRBP II), o qual contém uma sequência alvo incomum para homeobox. A TGIF compete com os retinóides na ligação ao elemento responsivo RXRE-CRBP II, o que resulta em redução da atividade transcricional (BERTOLINO et al., 1995).

Tem sido demonstrado que a TGIF atua na via de sinalização da família TGF- β (fator de crescimento transformante). A TGIF está localizada no núcleo e a interação da TGIF com as Smads leva ao recrutamento da TGIF para os elementos

responsivos das Smads e conseqüentemente a repressão de genes ativados pelo TGF- β . A TGIF é capaz de se associar as Smad2 e Smad3 e reprimir a transcrição através dessas proteínas. A atividade repressiva desse complexo TGIF-Smad é parcialmente dependente da atividade da histona deacetylase recrutada pela TGIF, assim como pela competição com co-ativadores transcripcionais como a p300 (CHEN et al., 2003; WOTTON et al., 1999). Outras proteínas também estão envolvidas nesse processo, a proteína c-Jun interage com a TGIF formando um complexo envolvido na repressão da Smad2 mediada pelo TGIF (PESSAH et al., 2001).

Foi sugerido que o próprio *TGIF* seria um alvo de TGF- β . Através de experimentos com culturas de células e RT-PCR foi verificado que células tratadas com TGF- β 1 e activina exibiam níveis elevados de TGIF e que o promotor do *TGIF* era estimulado por essas proteínas. Esses fatos indicam que o *TGIF* seria um alvo da sinalização de TGF- β 1 e activina, e estaria envolvido num controle de feedback negativo para diminuir a ação de TGF- β (CHEN et al., 2003).

Outras vias de sinalização parecem estar envolvidas no controle da expressão do *TGIF* e conseqüentemente na via do TGF- β . Lo, Wotton e Massagué (2001), através de experimentos com transfecção em culturas de células, demonstraram que a proteína TGIF tem uma vida curta, mas que o EGF (fator de crescimento epidérmico) sinalizando através da via Ras/MAP cinase causa fosforilação da TGIF em dois sítios na região C-terminal estabilizando-a, aumentando sua meia-vida e assim favorecendo a formação do complexo co-repressor Smad2-TGIF. Essa regulação dos níveis de TGIF através da via de sinalização EGF/Ras/MAPcinase permite de maneira seletiva e efetiva ajustar o nível de transcrição ativada por Smads. Assim, a TGIF promove dentro do núcleo uma ligação potencial entre os sinais da via EGF/Ras/MAPcinase e da via TGF- β que

exerce diferentes efeitos na expressão gênica dependendo dos diferentes níveis de sinalização. Durante a oncogênese, a transformação através da desregulação do Ras ou EGF e suas cinases correspondentes, nos vários tipos de células epiteliais, modifica suas respostas ao TGF- β , adquirindo resistência à inibição do crescimento mediada pelo TGF- β e permitindo outras respostas como a produção de matrix extracelular, mobilidade celular e estimulação da angiogênese. Os autores sugerem que a estabilização da TGIF através da via EGF/Ras/MAPcinase promoveria um mecanismo para a modificação das respostas das Smads.

Levando-se em consideração a sua atuação nas vias de sinalização acima, o papel da TGIF na carcinogênese vem sendo discutido em algumas neoplasias. Nakakuki et al. (2002) através de CGH e FISH mapearam a região do cromossomo 18p em linhagens celulares de CE de esôfago e identificaram a amplificação e conseqüentemente a superexpressão de TGIF. Os autores verificaram também que as linhagens celulares que exibiam superexpressão da TGIF exibiram resistência à inibição de crescimento mediada pelo TGF- β 1 quando comparadas às linhagens que não superexpressavam essa proteína. Os autores concluem que o gene *TGIF* está ativado nessa neoplasia através de amplificação gênica e envolvido na oncogênese por mecanismos como a diminuição da habilidade dos sinais da via TGF- β em prevenir a progressão do ciclo celular.

Hu et al. (2005) observaram que culturas de células de carcinoma gástrico transfectadas com TGIF não apresentaram comportamento biológico mais agressivo (como crescimento mais acelerado ou maior índice de apoptose) quando comparadas ao controle. Os autores mostraram que o número de organelas nas células transfectadas era maior que nas células controles. Além disso, tecidos neoplásicos de camundongos inoculados com células que expressavam TGIF não

exibiram necrose, o que foi observado no grupo controle. Foi sugerido que a expressão de TGIF pode induzir, pelo menos em parte, a diferenciação nessa linhagem celular. Os autores observaram ainda que as células transfectadas com TGIF adquiriram resistência a inibição do crescimento quando tratadas com TGF- β 1, e, como já mostrado por outros autores, que a superexpressão de TGIF poderia inibir a regulação negativa do TGF- β no ciclo celular.

Borlak et al. (2005), através do uso de camundongos transgênicos para EGF investigaram a carcinogênese hepática e observaram a superexpressão de diversas proteínas, incluindo TGIF, em amostras não neoplásicas de fígado de camundongos transgênicos quando comparadas a amostras controles normais. Os autores sugerem que a superexpressão dessas proteínas seriam eventos iniciais que predisporiam as células hepáticas à transformação maligna.

O envolvimento dos genes homeobox *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* na carcinogênese de boca ainda não foi investigado. Frente as suas participações em outras neoplasias, bem como as suas funções estabelecidas pela literatura, inclusive relacionadas a fatores ligados ao carcinoma epidermóide de boca, nos propusemos a verificar através de técnicas de biologia molecular a presença de seus transcritos nessas neoplasias.

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a presença de transcritos dos genes *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* em carcinomas epidermóides de boca e em tecidos não tumorais adjacentes, através da amplificação por RT-PCR e localização celular pela hibridização “in situ”, analisando sua possível associação com aspectos clínicos e histopatológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos espécimes

Foram obtidos fragmentos de tecido tumoral e tecido não tumoral adjacente de 22 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. Os fragmentos foram removidos de forma a não comprometer a análise histológica, principalmente a margem cirúrgica. A obtenção do material, sem prejuízo para o tratamento global do paciente e através de parâmetros cirúrgicos, foi autorizada pela 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 sob o número de Protocolo 566/01 (Anexo A), estando a Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP ciente e de acordo (CEP/FO – 163/02).

Durante o ato cirúrgico para remoção da lesão foi retirado fragmento da porção interna da neoplasia, bem como porção não tumoral de uma região adjacente. Esses fragmentos foram armazenados separadamente em paraformaldeído a 4% para cada paciente. Parte do material de cada um desses fragmentos foi destinada a extração de RNA para as reações de RT-PCR e para o preparo das sondas necessárias para as reações de ISH. Outra parte do material foi processada para embebição em OCT e então ser submetida a cortes em criostato

para confecção das lâminas a sofrerem a ISH. Esses espécimes foram disponibilizados para a pesquisa por cirurgiões de cabeça e pescoço do HC responsáveis pela cirurgia e trazidos ao nosso laboratório por alunos da Liga Interdisciplinar das Neoplasias Bucais (LIMB) da FOU SP, e ficaram armazenados em um freezer a -80°C .

4.2 Seguimento Clínico dos Pacientes

Os casos tiveram dados colhidos por acadêmicos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e membros da Liga Interdisciplinar das Neoplasias Bucais (LINB), que também acompanham o seguimento do paciente, sob orientação dos responsáveis pelo presente projeto. Dados como evolução clínica, estadiamento e características histopatológicas, entre outros aspectos clínicos, serão utilizados juntamente com os achados moleculares. A consulta aos prontuários do HCFMUSP e o seguimento dos pacientes, seguem normas do hospital e foram autorizados pelo chefe da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

4.3 Obtenção do RNA

RNA total de parte dos tumores e tecido não tumoral adjacente foi obtido, utilizando-se TRIzol segundo orientação do fabricante (Gibco, BRL, São Paulo,

Brasil). Os tecidos removidos cirurgicamente foram colocados em tubos Eppendorfs em gelo seco para transporte sendo armazenados a -80°C. Posteriormente o tecido foi transferido para um almofariz contendo nitrogênio líquido e, triturado até a obtenção de um pó. A este pó foi adicionada solução de TRIzol, na proporção de 1 ml para cada 50g de tecido, e, após homogeneização, o material foi transferido para tubos de 1,5 ml e mantido no gelo por 5 minutos, sendo, então, transferido para temperatura ambiente por 3 minutos. Para cada 1ml de TRIzol utilizado, foram adicionados 200 ml de clorofórmio e, após centrifugação a 15.000 rpm (substituir por x g) a 4°C por 15 minutos, a fase aquosa foi transferida para novos tubos, quando 500 ml de isopropanol foram acrescentados. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 75%. Cada precipitado foi dissolvido em 25 a 50 µl de água destilada e deionizada estéril dependendo do tamanho do precipitado. A leitura da absorbância foi então realizada em espectrofotômetro e a produtividade da reação foi calculada pela fórmula: OD x diluição x 40/1000. A integridade dos RNAs foi verificada em gel de agarose. Todos os procedimentos bem como os descritos a seguir foram efetuados em condições livres de RNase.

4.4 PCR

O RNA obtido foi submetido a tratamento com DNase I antes da síntese do cDNA utilizando-se a técnica do RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). O protocolo utilizado foi o preconizado pelo fabricante com o uso da

enzima superscript II (Invitrogen, Carlsbad, USA). Brevemente, ao RNA tratado com 2 U de DNase I foram adicionados 2 µl de oligo(dT) (Invitrogen) e água miliQ para completar 13 µl. Os tubos foram aquecidos a 70°C resfriados rapidamente e então adicionados a cada tubo tampão apropriado, DTT e dNTPs (“deoxynucleoside triphosphate”). Os tubos permaneceram 10 minutos à temperatura de 25°C, sendo então aquecidos durante 2 minutos a 42°C. A cada tubo foi adicionado 1 ml da enzima superscript, então mantidos a 42°C por 50 minutos e a reação finalizada a 70°C por 15 minutos com o intuito de neutralizar a enzima. Os cDNAs obtidos foram armazenados em freezer a – 20°C.

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), utilizando-se primers específicos para parte da sequência dos transcritos dos genes em estudo *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* (Tabela 4.1). Esses primers foram desenhados com base em sequências obtidas no GeneBank, com auxílio do software GeneTool®, sendo que as sequências dos primers forward e reverse estão localizadas em diferentes exons. Como os genes *HOXC6* e *TGIF* apresentam mais de uma variante e não era nosso objetivo no momento avaliá-las individualmente, os primers foram desenhados em regiões similares para todos os transcritos de modo que a amplificação ocorresse para qualquer um deles. Além disso esses primers foram desenhados em regiões de homologia com camundongos para que cDNA de embrião de camundongo fosse utilizado como controles nas reações.

Todas as amostras de cDNA foram amplificadas com o gene constitutivo da β -actina.

Tabela 4.1 - Sequência dos primers utilizados para a reação de RT-PCR

	<i>Acesso</i>	<i>Senso 5'®3'</i>	<i>Anti-senso 5'®3'</i>	<i>Produto (pb)</i>
HOXA7	NM_006896	tgccctgcgcctcctacgacc	cggcggcagtcggaccttcgt	354pb
HOXC6	NM_153693	tcgccctcaattccaccgcctat	ttccacttcattccggcggttct	521pb
TGIF	NM_170695	ggctcctccctgacatgctg	tgcaacatccactagaagctg	497pb

Acesso = número de acesso no GeneBank, pb = pares de bases

Para cada reação de amplificação, os seguintes reagentes foram adicionados a um tubo de 1,5 ml, cDNA, primers senso e anti-senso, dNTPs (Invitrogen), tampão 10X (Gibco Invitrogen), MgCl₂ (Invitrogen), enzima Taq polimerase (Invitrogen), BSA (soro de albumina bovina) e água miliQ autoclavada. A concentração dos reagentes foi otimizada para cada par de primers (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Concentrações dos reagentes utilizados para cada par de primers

	água	tampão	MgCl₂	dNTP	senso	anti-senso	BSA	Taq	cDNA
HOXA7	p/25µl	1X	1,5mM	0,26mM	5pMol	5pMol	-	2U	0,5µl
HOXC6	p/25µl	1X	2mM	0,26mM	5pMol	5pMol	0,4µg/µl	2U	0,5µl
TGIF	p/25µl	1X	1,5mM	0,26mM	5pMol	5pMol	0,4µg/µl	2U	0,5µl

O equipamento utilizado foi o termociclador PTC-100 (Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Inc) para o TGIF, e o Mastercycler® para o HOXA7 e o HOXC6. Cada reação de amplificação foi realizada com o uso de soluções mix com o intuito de padronizar a pipetagem. As condições de ciclagem também foram otimizadas (Tabela 4.3). Controles positivos (cDNA de embrião de camundongo para o HOXC6 e TGIF e mucosa adjacente não tumoral para o HOXA7) e negativos (isento de cDNA) foram utilizados em todas as reações.

Tabela 4.3 - Condições de ciclagem para os diferentes iniciadores

	<i>HOXA7</i>	<i>HOXC6</i>	<i>TGIF</i>
pré-desnaturação	94°C – 3'	94°C – 3'	94°C – 3'
ciclagem	41 ciclos	35 ciclos	33 ciclos
desnaturação	94°C – 1'	94°C – 1'	94°C – 1'
associação	65°C – 50"	62°C – 50"	50°C – 50"
extensão	72°C – 1'	72°C – 1'	72°C – 1'
Extensão final	72°C – 7'	72°C – 7'	72°C – 7'

Para determinar o número de ciclos a serem utilizados foi realizado um platô, retirando-se tubos em diferentes ciclos. Um exemplo dessa reação pode ser observado na Figura 4.1.

Figura 4.1. Gel em agarose 2% do platô do TGIF;

pp = padrão de pares de bases pb = pares de bases

Os resultados das reações foram avaliados em gel de agarose a 2% contendo brometo de Etídio 0,5 µg/ml (Invitrogen), e visualizados em luz UV, e documentados com câmara Polaroid. As reações foram realizadas em triplicata.

Para análise estatística foram utilizados os softwares: MSOffice **Excel** versão 2000 para o gerenciamento do banco de dados; **SPSS** for Windows versão 10.0 para a execução dos cálculos estatísticos elaboração e edição de gráficos e na elaboração das tabelas e redação usaremos o MSOffice **Word** versão 2000.

4.5 Subclonagem

Para subclonagem dos genes foi utilizado o sistema TOPO TA de clonagem (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. Inicialmente foi realizada a ligação do inserto ao vetor. Para isso foram misturados 0,5 a 4 µl de produto de PCR fresco, 1µl de solução salina, água estéril para 5µl e 1µl do vetor TOPO, deixando-se 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a transformação. Brevemente, 30 µl de células E. coli (One Shot) fornecidas com o kit ficaram

incubadas em gelo por 30 minutos com 5 µl do vetor contendo o inserto e a seguir sofreram rápido aquecimento a 42°C por 30 segundos em banho-maria. Foi, então, adicionado 250µl de meio SOC com MgCl₂ e incubado sob vigorosa agitação à 37°C por 1 hora. Usando técnica estéril, 10 a 100 µl da solução plasmídio-bactéria foram transferidos para placas de agarose com ampicilina que ficaram incubadas durante a noite à 37°C. Dez colônias bacterianas foram coletadas de cada placa sendo transferidas e cultivadas em diferentes tubos Falcon 5029 contendo 5 ml de meio LB Broth e ampicilina (50 µg/ml) que ficaram sob vigorosa agitação durante 8 horas a 37°C. Para a confirmação da presença do inserto, 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 a 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 com os primers específicos.

As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento automático. Para isso 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 nessas bandas, de maneira que a intensidade da banda do produto de PCR correspondesse a pelo menos 20 ng de cDNA. Então foram feitas purificações desses produtos com a utilização de 2µl da enzima Exosap (kit Exosap®, Invitrogen) para cada 5µl do produto de PCR. Assim, 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 finalmente enviado para

sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, juntamente com os iniciadores específicos.

Após a confirmação foram adicionados 500 ml do meio LB Broth e ampicilina (50 µg/ml) e novamente incubado nas mesmas condições durante a noite. No dia seguinte, uma alíquota da suspensão bacteriana foi retirada, misturada com glicerol na concentração de 6:1 e congelada a -80°C. O restante foi transferido para frascos de 250 ml e centrifugado a 6500 rpm durante 15 minutos, e o pellet resultante submetido à extração de DNA através do sistema Wizard (Promega, Madison, WI, USA). Brevemente, o pellet foi levantado com o a solução de suspensão celular (Tris-HCl 50mM, pH 7.5; EDTA 10mM; RNase A 100µg/ml) e a este volume adicionado solução de lise (NaOH 0.2M; SDS 1%). Quando a solução se tornou clara e viscosa foi adicionado ao volume solução neutralizadora e o total centrifugado a 9500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi então coletado, adicionado isopropanol na concentração de 1:2, e centrifugado novamente a 9500 rpm durante 15 minutos à TA. O corpo de fundo obtido foi dissolvido com 2 ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.5; EDTA 1mM) e acrescido de resina pré-aquecida a 30°C. A mistura DNA-resina foi transferida para colunas acondicionadas a um aparato de vácuo e submetidas a seguinte solução: NaCl 85mM, Tris-HCl pH 7.5, 8.5mM e EDTA 2mM. As colunas foram lavadas com álcool 80% e secadas sob centrifugação e vácuo. O DNA foi eluído da coluna com tampão TE pré-aquecido e estocado a 4°C. A concentração final do DNA foi obtida por densidade óptica em espectrofotômetro.

4.6 Preparo da sonda

O plasmídio foi digerido a 37°C durante aproximadamente 4 horas, em presença da enzima de restrição (Tabela 4.4) (na concentração de 15%) do tampão indicado (na concentração de 10%) e de água (25% do total). A síntese de RNA foi efetuada num tubo Eppendorf contendo 1% de DNA linearizado, 40% de água, 1% de tampão de transcrição (10X), 1% de DTT (“Dithiothreitol”), 1% de oligonucleotídeos marcados com digoxigenina, 0.5% de inibidor de RNase e 0.5% de RNA polimerase, durante 2 horas à 37°C.

Tabela 4.4 - Enzimas de restrição utilizadas para linearização dos plasmídeos e polimerase utilizada na transcrição da sonda

<i>Plasmídeo</i>	<i>Enzimas restrição transcrita com Sp6 polimerase</i>	<i>Enzima restrição transcrita com T7 polimerase</i>
HOXA7	XbaI	HindIII
TGIF	EcoRV	BamHI

A inspeção da sonda de RNA foi efetuada em um gel de 1% de agarose em TAE contendo Brometo de Etídio na concentração de 10 mg/ml. Antes de adicionada ao gel, a sonda foi misturada com 80% de água e 10% de tampão de carga. O resultado foi observado numa câmara de transluminescência e documentado em filme polaróide (Figura 4.2).

Figura 4.2 Foto de gel de agarose 2% mostrando plasmídeo, sua linearização com diferentes enzimas e as sondas transcritas antes da digestão com Dnase I.

pp = padrão de pares de bases; pl = plasmídeo; X = plasmídeo linearizado com XbaI; H= plasmídeo linearizado com HindIII; E= plasmídeo linearizado com EcoRV; B= plasmídeo linearizado com BamHI.

Após a inspeção, com a finalidade de precipitação do RNA foi adicionado ao restante do volume da sonda; água, cloreto de lítio, DNase e etanol.

4.7 Hibridização “In Situ”

O método utilizado foi o descrito previamente por Wu e Oh (1996). As lâminas contendo cortes dos tumores foram descongeladas e deixadas para secar, antes de serem submetidas à solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0.2% em PBS durante 10 minutos à TA. A seguir, foram transferidas para recipientes (TissueTek, VWR) onde ficaram imersas numa sequência de 6% H_2O_2 , proteinase K 7 $\mu g/ml$ (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 nesse tampão.

As lâminas assim processadas foram pré-hibridizadas em grupo de 4 num saco plástico selado pelo calor, e imersas na solução de hibridização onde ficaram

durante 1 hora a 47°C (TGIF) e 52°C (HOXA7) no forno de hibridização. A solução de hibridização consiste em formamida 50%, 5X SSC (pH 4.5), heparina 50 mg/ml, RNA de levedura 50 mg/ml, 1% SDS e água para completar 50 ml, pré aquecida a 70°C.

Antes de ser adicionada à solução de hibridização, a sonda de RNA foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, lavada com etanol 70% e centrifugada nas mesmas condições novamente. O corpo de fundo foi dissolvido com 40 µl de água de onde foram retirados de 10 a 15µl (na dependência da concentração da sonda) para adição em cada saco plástico contendo as lâminas em solução de hibridização. As lâminas ficaram incubadas nessa solução durante a noite, no forno de hibridização a 47°C (TGIF) e 52°C (HOXA7).

No dia seguinte as lâminas foram removidas dos sacos plásticos, e lavadas numa solução estrigente a 47°C (TGIF) e 52°C (HOXA7), com 3 trocas de 15 minutos, num banho-maria sob agitação. Essa solução consiste de formamida a 50%, 20X SSC (pH 4.5) a 30%, 10X SDS à 10% e 10% de água, pré aquecida a 70°C. O mesmo procedimento foi repetido para uma solução de formamida à 50%, 20X SSC (pH 4.5) à 12%, e 38% de água, mas na temperatura de a 42°C (TGIF) e 47°C (HOXA7).

As lâminas foram então 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 foram bloqueadas com soro de ovelha à 10% nessa mesma solução durante 1 hora à TA.

Após o bloqueio as lâminas foram novamente colocadas em grupo de 4 num saco plástico selado pelo calor, e imersas numa solução contendo o anticorpo anti-

digoxigenina onde ficaram durante 18 horas a 4°C sob agitação. Essa solução continha soro de ovelha à 1:300 e anticorpo anti-digoxigenina à 1:2000.

Terminada a incubação com o anticorpo, as lâminas foram lavadas extensivamente 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% e levamisole à 0.048% em água). A detecção da reação ocorreu no escuro, com NBT (75 mg/ml em dimetilformamida 30%) e BCIP (50 mg/ml em água) misturados com NTMT na concentração de 1:300 e 1:380 respectivamente, durante o tempo necessário para visualização do sinal. A reação foi bloqueada com PBT e EDTA (0.5M) na proporção de 1:500. O resultado da reação está sendo analisado e documentado fotograficamente em um microscópio Zeiss, Jenapol.

5 RESULTADOS

A relação dos 20 casos em estudo, assim como seus dados clínicos e estadiamento estão apresentados no Anexo B.

Com o objetivo apenas de caracterizar a amostra estudada, apresentamos em forma de tabelas, as frequências relativas (percentuais) e absolutas (N) das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas foram utilizadas médias e medianas para resumir as informações, e desvios-padrão, mínimo e máximo para indicar a variabilidade dos dados.

Em relação ao perfil dos pacientes, a maioria deles estava representada por homens, brancos, fumantes, etilistas (Tabela 5.1), situados entre a 2a e 8a décadas de vida e com uma média de 56 anos de idade (Tabela 5.2). As lesões estavam localizadas preferencialmente na língua (70%). As outras localizações foram: Lábio inferior, assoalho, maxila, mento e trígono retromolar (30%). De acordo com a classificação UICC (Union Internationale Contre le Câncer) a maioria das lesões apresentavam estadiamento avançado (III e IV) (70%), e de acordo com a classificação TNM a maior parte das lesões apresentavam tamanho entre T3 e T4 (55%), com linfonodos negativos em 60% do total de casos (Tabela 5.3). As características de tamanho, espessura e invasão estão relacionadas na tabela 5.2 e tabela 5.4 respectivamente.

Tabela 5.1 - Distribuição amostral segundo as características demográficas e de hábito dos pacientes

Características do paciente	N (N=20)	%
Fumo		
ausente	7	35
presente	11	55
Sem informação	2	10
Alcool		
ausente	9	45
presente	8	40
Sem informação	3	15
Cor		
Branca	18	90
Negra	1	5
Amarela	1	5
Sexo		
Feminino	8	40
Masculino	12	60

N = número de casos

Tabela 5.2 - Estatísticas descritivas da amostra segundo Idade do paciente, tamanho e espessura do tumor (cm)

	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Idade	20	56,95	56	18,3	17	87
Tamanho (cm)	17	3,224	2,5	2,191	0,9	9
Espessura (cm)	18	1,233	1,2	0,901	0,2	4

N = número de casos

Tabela 5.3 - Distribuição amostral segundo as características do tumor

Características do tumor	N (N=20)	%
Local		
Língua	14	70
Outras localizações	6	30
UICC		
Precoce (estadio I e II)	5	25
Avançados (estadio III e IV)	14	70
Sem informação	1	5
T (TNM)		
T1+T2	9	45
T3+T4	11	55
N (TNM)		
linfonodos negativos	12	60
linfonodos positivos	8	40

N = número de casos; TNM = Classificação onde T= extensão do tumor, N = metástases em linfonodos, M = metástases à distância; UICC = Union Internationale Contre le Câncer onde pacientes são divididos em precoces (I e II) e avançados (III, IV)

Tabela 5.4 - Distribuição amostral segundo as características de invasão

	N (N=20)	%
Invasão vascular		
ausente	15	75
presente	2	10
Sem informação	3	15
Invasão neural		
ausente	9	45
presente	8	40
Sem informação	3	15

N = número de casos

5.1 RT-PCR

Os resultados obtidos através da técnica RT-PCR estão apresentados abaixo em relação aos transcritos de cada gene estudado.

5.1.1 HOXC6

Quando da utilização da técnica RT-PCR, não observamos amplificação do transcrito do gene *HOXC6* em nenhum dos casos de carcinoma epidermóides de boca estudados bem como para seus tecidos não tumorais adjacentes (Figura 5.1). Utilizamos cDNA de embrião de camundongo como controle positivo para todas as reações, pois se sabe que durante a embriogênese de camundongos este gene é expresso. Vale ressaltar que os iniciadores foram planejados de forma a amplificar regiões com grande identidade de seqüência entre humanos e camundongos.

Figura 5.1 – Exemplo de gel em agarose 2% mostrando não amplificação dos transcritos de gene *HOXC6* nos casos 3, 5, 7 e 8. C-=controle negativo; C+= controle positivo; tn=tecido não tumoral adjacente; tu= tumor; pp = padrão de pares de bases pb = pares de base

A subclonagem e sequenciamento de amostras amplificadas pela RT-PCR a partir do controle camundongo confirmaram a amplificação específica do transcrito do *HOXC6*. A Figura 5.2 mostra o cromatograma referente à seqüência do mRNA do *HOXC6* obtida após o sequenciamento.

A não amplificação de transcritos do gene *HOXC6* utilizando-se a técnica de RT-PCR nos casos estudados fez com que deixássemos de utilizar a técnica de hibridização *in situ* para esse transcrito em nosso estudo.

Figura 5.2 - Cromatograma mostrando parte da sequência dos transcritos do *HOXC6* amplificados por RT-PCR e enviados para sequenciamento

5.1.2 HOXA7

A amplificação do transcrito do *HOXA7* foi verificada em 14 (70%) dos 20 casos estudados (tabela 5.5), sendo que em 3 (15%) casos apenas no tecido não tumoral adjacente (TN), 9 (45%) casos somente no tumor (TU) e em 2 (10%) casos em ambas as amostras (tumor e tecido não tumoral adjacente). A Figura 5.3 ilustra a amplificação do transcrito do *HOXA7* para alguns casos.

Tabela 5.5 Amplificação por RT-PCR do transcrito do gene *HOXA7* nos casos de carcinoma epidermóide e seus tecidos não tumorais adjacentes

CASOS	TN	TU	CASOS	TN	TU	CASOS	TN	TU
1	sim	não	8	não	não	15	sim	não
2	não	sim	9	não	sim	16	sim	não
3	não	não	10	não	sim	17	não	não
4	não	sim	11	não	sim	18	não	não
5	não	não	12	não	sim	19	não	não
6	sim	sim	13	não	sim	20	sim	sim
7	não	sim	14	não	sim			

TN = tecido não tumoral adjacente; TU = tumor

Figura 5.3 – Exemplo de gel em agarose 2% mostrando amplificação por RT-PCR de transcritos do *HOXA7* nos casos 6, 10, 11 e 14. C=controle negativo; C+= controle positivo; tn = tecido não tumoral adjacente; tu = tumor; pp = padrão de pares de bases pb = pares de bases

A subclonagem e sequenciamento de amostras amplificadas pela RT-PCR do transcrito do *HOXA7* confirmaram a amplificação específica do mRNA desse gene. A Figura 5.4 exhibe parte do cromatograma obtido após sequenciamento do produto de RT-PCR e mostra parte da sequência do transcrito do *HOXA7*.

Figura 5.4 – Parte do cromatograma obtido após sequenciamento do produto de RT-PCR, contendo parte do transcrito do *HOXA7*

Foi realizada análise estatística para avaliar se havia concordância ou não entre a amplificação de transcritos do *HOXA7* nos TNs e TUs. Também foi feita a correlação da amplificação deste transcrito nas amostras de tecido neoplásico com as variáveis clínicas. Para descrevermos a concordância entre dois métodos, utilizamos a medida de Kappa (PEREIRA, 1999). Para avaliar se a concordância é razoável, fizemos um teste estatístico para estabelecer a significância do Kappa. Para comparar as distribuições de frequência das variáveis qualitativas foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson (VIEIRA, 1998). O teste exato de Fisher foi utilizado nas situações onde os valores esperados foram inferiores a 5. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05.

Os resultados da análise do Kappa estão apresentados na Tabela 5.6 onde Kappa = 0,143 e $p = 0,436$. Através desse resultado, podemos afirmar que não existe concordância significativa ($p > 0,05$) entre os resultados da amplificação dos transcritos do *HOXA7* nas amostras TN e TU. Sendo assim foi realizado outro teste estatístico para avaliarmos a associação da amplificação do transcrito em TN e TU

(teste Exato de Fisher), mas o resultado não foi estatisticamente significativo ($p=0,617$).

Tabela 5.6 - Análise da concordância entre a presença de transcritos do *HOXA7* em TN e TU

			TU		Total
			ausente	presente	
TN	ausente	N	6	9	15
		%	66,70%	81,80%	75,00%
	presente	N	3	2	5
		%	33,30%	18,20%	25,00%
Total		N	9	11	20
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Kappa = 0,143 (p -valor = 0,436); Teste Exato de Fisher $p = 0,617$; N = número de casos; TN = tecido não tumoral adjacente; TU = tumor

A associação entre a amplificação do transcrito *HOXA7* nas amostras TU com o local da lesão foi estatisticamente insignificante ($P=0,642$) (Tabela 5.7). O mesmo ocorreu para as variáveis estadiamento de acordo com a classificação UICC ($p>0,999$) (Tabela 5.8), extensão do tumor (T) ($P=0,964$) (Tabela 5.8) e linfonodos positivos ($p>0,999$) (Tabela 5.10) na classificação TNM, e para as variáveis invasão vascular ($p=0,485$) e neural ($p>0,999$) (Tabela 5.11).

Tabela 5.7 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *HOXA7* nas amostras TU e local da neoplasia

			Transcrito HOXA7 em TU		Total
			ausente	presente	
Local	Língua	N	7	7	14
		%	77,80%	63,60%	70,00%
	Outras localizações	N	2	4	6
		%	22,20%	36,40%	30,00%
Total		N	9	11	20
		%	100,00%	100,00%	100,00%

p -valor = 0,642 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos

Tabela 5.8 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *HOXA7* nas amostras TU com estadiamento UICC

		UICC		Total (N=19)
		Precoce (N=5)	Avançados (N=14)	
Transcrito HOXA7 em TU	ausente	N	2	9
		%	22,20%	100,00%
	presente	N	3	10
		%	30,00%	100,00%

p > 0,999 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos; UICC = Union Internationale Contre le Câncer onde pacientes são divididos em precoces (Estádios I e II) e avançados (III, IV)

Tabela 5.9 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *HOXA7* nas amostras TU com o T(TNM)

		T (TNM)		Total (N=20)
		T1+T2 (N=9)	T3+T4 (N=11)	
Transcrito HOXA7 em TU	ausente	N	4	9
		%	44,40%	100,00%
	presente	N	5	11
		%	45,50%	100,00%

p = 0,964 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos; TNM = Classificação onde T= extensão do tumor, N = metástases para linfonodos, M = metástases à distância

Tabela 5.10 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *HOXA7* nas amostras TU com as metástases em linfonodos N(TNM)

		Transcrito HOXA7 em TU		Total (N = 20)
		ausente	presente	
linfonodos negativos	N	5	7	12
	%	55,6%	63,60%	60,00%
linfonodos positivos	N	4	4	8
	%	44,4%	36,4%	40,00%

p-valor > 0,999 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos; TNM = Classificação onde T= extensão do tumor, N = metástases em linfonodos, M = metástases à distância

Tabela 5.11 - Análise da associação entre a amplificação do transcrito HOXA7 nas amostras TU e a invasão vascular e neural

		Transcrito HOXA7 em TU		Total (N=17)	p-valor
		ausente (N=7)	presente (N=10)		
Invasão vascular	ausente	N	7	8	0,485 _F
		%	100,00%	88,20%	
	presente	N	2	2	
		%	20,00%	11,80%	
Invasão neural	ausente	N	4	5	>0,999 _F
		%	57,10%	52,90%	
	presente	N	3	5	
		%	42,90%	47,10%	

F = teste Exato de Fisher; N = número de casos; TU = tumor

Com relação às variáveis quantitativas (tamanho e espessura do tumor), utilizamos o teste tStudent (VIEIRA, 1998). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre a amplificação ou não dos transcritos do *HOXA7* nas amostras de CEs de boca com relação ao tamanho ($p = 0,784$) nem com a espessura ($p = 0,118$) das neoplasias estudadas (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Comparações das médias do tamanho e espessura das neoplasias com relação à amplificação dos transcritos do *HOXA7* nas amostras TU

	Transcrito HOXA7 em TU	N	Média	Desvio Padrão	p-valor t-Student
Tamanho (cm)	ausente	6	3,02	3,09	0,784
	presente	11	3,34	1,69	
Espessura (cm)	ausente	7	0,81	0,50	0,118
	presente	11	1,50	1,02	

TU = tumor; N = número de casos.

As análises estatísticas correlacionando a amplificação ou não dos transcritos do *HOXA7* nos carcinomas epidermóides de boca com as variáveis apresentadas acima não demonstraram resultados estatisticamente significantes, sendo assim não houve associação entre a amplificação de transcritos *HOXA7* nos casos estudados com os fatores clínicos avaliados.

5.1.3 TGIF

A amplificação dos transcritos do *TGIF* foi verificada em 16 (80%) dos 20 casos estudados (Tabela 5.13), sendo que em 1 (5%) caso apenas no tecido não tumoral adjacente, 4 (20%) casos somente no tumor e em 11 (55%) casos em ambas as amostras (tumor e tecido não tumoral adjacente). A Figura 5.5 ilustra a amplificação do transcrito do *TGIF* para alguns casos.

Tabela 5.13 – Amplificação dos transcritos do gene *TGIF* nos casos de carcinoma epidermóide e tecidos não tumorais adjacentes

CASOS	TN	TU	CASOS	TN	TU	CASOS	TN	TU
1	não	sim	8	não	não	15	sim	sim
2	não	sim	9	sim	sim	16	sim	sim
3	sim	não	10	sim	sim	17	não	não
4	não	sim	11	sim	sim	18	sim	sim
5	não	não	12	sim	sim	19	não	não
6	não	sim	13	sim	sim	20	sim	sim
7	sim	sim	14	sim	sim			

TN = tecido não tumoral adjacente; TU = tecidotumoral

Figura 5.5 – Exemplo de gel em agarose 2% mostrando amplificação de transcritos do *TGIF* nos casos 3, 4, 14, e 15. C=controle negativo; C+= controle positivo; tn = tecido não tumoral adjacente; tu = tumor; pp = padrão de pares de bases pb = pares de bases

A subclonagem e sequenciamento de amostras amplificadas pela RT-PCR do transcrito do *TGIF* confirmaram a amplificação específica do mRNA desse gene. A Figura 5.6 mostra parte do cromatograma referente à sequência do mRNA do *TGIF* obtida após o sequenciamento.

Figura 5.6 – Parte do cromatograma obtido após sequenciamento do produto de RT-PCR contendo parte do transcrito do *TGIF*

Da mesma forma que para o *HOXA7* foi realizada análise estatística para avaliar se havia concordância ou não entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nos TNs e TUs . Também foi feita a correlação da amplificação deste transcrito nas amostras de tecido neoplásico com as variáveis clínicas.

Os resultados da análise do Kappa estão apresentados na Tabela 5.14 onde Kappa = 0,444 e $p = 0,0035$. Através desse resultado, podemos afirmar que houve concordância significativa ($p < 0,05$) entre os resultados da amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TN e TU.

Tabela 5.14 - Análise da concordância entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* em TN e TU

		TU			Total
		ausente	presente		
TN	ausente	N	4	4	8
		%	80,00%	26,70%	40,00%
	presente	N	1	11	12
		%	20,00%	73,30%	60,00%
Total		N	5	15	20
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Kappa = 0,444 (p -valor = 0,035); N = número de casos; TN = tecido não tumoral adjacente; TU = tumor

A associação entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU com o local da lesão foi estatisticamente insignificante ($P > 0,999$) (Tabela 5.15). O mesmo ocorreu para as variáveis estadiamento de acordo com a classificação UICC ($p = 0,709$) (Tabela 5.16), extensão do tumor (T) ($P > 0,999$) (Tabela 5.17) e linfonodos positivos ($p > 0,999$) (Tabela 5.18) na classificação TNM, e para as variáveis invasão vascular ($p > 0,999$) e neural ($p > 0,999$) (Tabela 5.19).

Tabela 5.15 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU e o local da neoplasia

		transcrito TGIF em TU		Total
		ausente	presente	
Local	Língua	N	4	10
		%	80,00%	66,70%
	Outras localizações	N	1	5
		%	20,00%	33,30%
Total		N	5	15
		%	100,00%	100,00%

p-valor > 0,999 (teste Exato de Fisher); N = número de casos; TU = tumor

Tabela 5.16 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU com o estadiamento UICC

			UICC		Total (N=19)
			Precoce (N=5)	Avançados (N=14)	
transcrito TGIF em TU	ausente	N	1	4	5
		%	20,00%	80,00%	100,00%
	presente	N	4	10	14
		%	28,60%	71,40%	100,00%

P=0,709 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos; UICC = Union Internationale Contre le Câncer onde pacientes são divididos em precoces (Estádios I e II) e avançados (III, IV)

Tabela 5.17 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU com a extensão do tumor (TNM)

			T (TNM)		Total (N=20)
			T1+T2 (N=9)	T3+T4 (N=11)	
transcrito TGIF em TU	ausente	N	2	3	5
		%	40,00%	60,00%	100,00%
	presente	N	7	8	15
		%	46,70%	53,30%	100,00%

p > 0,999 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos; TNM = Classificação onde T = extensão do tumor, N = metástases para linfonodos, M = metástases à distância

Tabela 5.18 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU com as metástases em linfonodos(TNM)

		Transcrito TGIF em TU		Total (N = 20)
		ausente	presente	
linfonodos negativos	N	3	9	12
	%	60%	60%	60 %
linfonodos positivos	N	2	6	8
	%	40%	40%	40%

p-valor > 0,999 (teste Exato de Fisher); TU = tumor; N = número de casos; TNM = Classificação onde T= extensão do tumor, N = metástases em linfonodos, M = metástases à distância

Tabela 5.19 - Análise da associação entre a amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU e a invasão vascular e neural

		transcrito TGIF em TU		Total (N=17)	p-valor
		ausente (N=5)	presente (N=12)		
Invasão vascular	ausente	N	5	10	>0,999 _F
		%	100,00%	83,30%	
	presente	N	2	2	
		%	16,70%	11,80%	
Invasão neural	ausente	N	3	6	>0,999 _F
		%	60,00%	50,00%	
	presente	N	2	6	
		%	40,00%	50,00%	

F= teste Exato de Fisher; N= número de casos, TU = tumor

Com relação às variáveis quantitativas não foi observado diferença estatisticamente significativa entre a amplificação ou não dos transcritos do *TGIF* nas amostras de CEs de boca com relação ao tamanho ($p = 0,708$) nem com a espessura ($p = 0,317$) das neoplasias estudadas (Tabela 5.20).

Tabela 5.20 - Comparações das médias do tamanho e espessura das neoplasias com relação à amplificação dos transcritos do *TGIF* nas amostras TU

	Transcrito TGIF em TU	N	Média	Desvio Padrão	p-valor t-Student
Tamanho (cm)	ausente	4	3,60	3,80	0,708
	presente	13	3,11	1,66	
Espessura (cm)	ausente	5	0,88	0,59	0,317
	presente	13	1,37	0,98	

TU = tumor; N = número de casos

As análises estatísticas correlacionando a presença ou não dos transcritos do *TGIF* nos CEs de boca com as variáveis apresentadas acima não demonstraram resultados estatisticamente significantes, sendo assim não houve associação entre a amplificação de transcritos *TGIF* nos casos estudados com os fatores clínicos avaliados.

5.2 Hibridização *in situ*

O sinal de hibridização *in situ* foi semelhante para os transcritos do *HOXA7* e do *TGIF*. Quando avaliamos as amostras de tecido não tumoral adjacente (TN) e de carcinoma epidermoíde de boca (TU) consideramos positividade para a presença do sinal de hibridização nas células epiteliais.

O epitélio morfológicamente normal presente nas amostras TN apresentou intensa sinalização para ambos os transcritos, mas notamos diferentes padrões de expressão entre os casos estudados. Algumas amostras exibiam sinal de ISH somente nas camadas basal e suprabasal. Em outros casos o sinal apresentou-se

disperso por todas as camadas e por vezes mais intenso na camada espinhosa ou mais proeminente nas camadas basal e suprabasal. Nenhum sinal foi observado na camada de paraqueratina recobrindo o epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado (Figura 5.7 A, B, C, D, E, F e Figura 5.8 A, B, C, D, E, F).

Nos carcinomas epidermóides os transcritos do *HOXA7* e *TGIF* estavam localizados nas células neoplásicas, sendo que a expressão era variável em diferentes regiões das neoplasias. Nas áreas bem diferenciadas o sinal de ISH era bem evidente no citoplasma das células neoplásicas das ilhas e cordões tumorais. As pérolas de queratina mostraram-se negativas para ambos os transcritos. Nas áreas menos diferenciadas das neoplasias, o sinal de ISH mostrava-se menos intenso. Por vezes o sinal de ISH apresentava uma aparência mais granular sendo difícil delimitar as células neoplásicas dispersas no estroma. Em algumas amostras que apresentavam o epitélio de superfície morfologicamente normal, notava-se um sinal de ISH bem mais intenso quando comparado ao das células neoplásicas pouco diferenciadas. Alguns casos foram negativos para os transcritos do *HOXA7* (Figuras 5.9 e 5.10).

O sinal foi observado predominantemente no citoplasma celular com coloração variando de azul a arroxeada (Figura 5.7 G e Figura 5.8 G). A sonda sense não apresentou nenhum sinal (Figura 5.7 H e Figura 5.9 H).

Figura 5.7 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para os transcritos do *HOXA7* no tecido não tumoral adjacente. A, C e E imagens em HE correspondentes a B, D e F. (B) Epitélio exibindo sinal de ISH disperso por todas as camadas epiteliais exceto a camada de paraqueratina. (D) Epitélio mostrando sinal de ISH disperso porém mais proeminente nas camadas basal e suprabasal. (F) Epitélio exibindo sinal de ISH predominantemente nas camadas basal e suprabasal. (G) Sinal de ISH no citoplasma das células epiteliais. (H) Sonda sense, nenhum sinal foi observado. Aumento de 25X para todas as imagens exceto (G) com 100X

Figura 5.8 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para transcritos do *TGIF* no tecido não tumoral adjacente. A, C e E imagens em HE correspondentes a B, D e F. (B) Epitélio exibindo sinal de ISH disperso por todas as camadas epiteliais exceto a camada de paraqueratina, notar que o sinal é mais intenso em algumas células. (D) Epitélio apresentando sinal de ISH disperso por todas as camadas, exceto a camada de paraqueratina sendo mais proeminente em área focal. (F) Epitélio exibindo sinal de ISH predominantemente nas camadas basal e suprabasal. (G) Sinal de ISH no citoplasma das células epiteliais. (H) Sonda sense, nenhum sinal foi observado. Aumento de 25X em todas as imagens exceto em (G) com 100X

Figura 5.9 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para os transcritos do *HOXA7* nos CE de boca. A, C, E e G imagens em HE correspondentes a B, D, F e H respectivamente. (B) carcinoma bem diferenciado mostrando sinal de ISH variável nas células neoplásicas, ilhotas e cordões, mas ausente nas pérolas de queratina. (D) Detalhe de ilhotas tumorais em carcinoma bem diferenciado mostrando intenso sinal da ISH mas praticamente ausente nas células da peróla de queratina. (F) Sinal discreto de ISH nas ilhas de células neoplásicas de carcinoma moderadamente diferenciado. (H) Área de carcinoma pouco diferenciado com sinal de ISH bem proeminente no epitélio de superfície tornando-se muito discreto nas células neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente. Aumento de 25X em todas as imagens, exceto em C e D com aumento de 100X

Figura 5.10 - Resultados da hibridização in situ com sonda antisense para transcritos do *TGIF* nos CEs de boca. A, C, E e G imagens em HE correspondentes a B, D, F e H respectivamente. (B) carcinoma bem diferenciado mostrando sinal de ISH variável nas células neoplásicas, ilhotas e cordões, mas ausente nas pérolas de queratina. (D) carcinoma moderadamente diferenciado exibindo sinal de ISH nas ilhas de células neoplásicas. (F) Sinal de ISH nos cordões de células neoplásicas de carcinoma menos diferenciado sendo mais evidente em células focais. (H) Área pouco diferenciada de CE de boca mostrando sinal de ISH proeminente no epitélio de superfície tornando-se muito discreto nas células neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente. Aumento de 25X em todas as imagens, exceto em E e F com aumento de 100X

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram pela primeira vez na literatura, o envolvimento dos genes homeobox *HOXA7* e *TGIF* na carcinogênese de boca sugerindo que a diminuição do sinal para transcritos desses genes possa estar relacionada aos eventos envolvidos nos CEs de boca.

Vários trabalhos têm considerado existir relações entre o desenvolvimento embrionário e a oncogênese, já que os dois processos são lados diferentes da mesma moeda. De um lado o equilíbrio entre processos que incluem a proliferação, a diferenciação e a morte celular e do outro lado o desequilíbrio dos mesmos (ARIAS, 2001; NUNES et al., 2003; EGAN, WEINBERG, 1993). Esses estudos fizeram com que diversos genes de desenvolvimento fossem pesquisados em diferentes neoplasias.

A escolha de transcritos dos genes homeobox, *HOXA7*, *HOXC6* e *TGIF* se deu devido à identificação dos mesmos no projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço (REIS et al., 2005). Porém nesse projeto havia neoplasias de diferentes origens e localizações, tornando necessária a confirmação da expressão dos transcritos de cada gene em CEs de boca.

Os resultados obtidos com a RT-PCR mostraram a não amplificação de transcritos do gene *HOXC6* tanto para as amostras de tecido não tumoral adjacente quanto para as amostras de carcinoma epidermóide de boca. A ausência de transcritos do *HOXC6* nesses tecidos mostra que este gene não se expressa nos tecidos bucais dos humanos adultos pesquisados (língua, lábio inferior, assoalho, maxila, mento e trígono retromolar), e nem em CEs dessas localizações, sugerindo a

ausência do envolvimento desse gene nesta neoplasia. Sua identificação no projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço (REIS et al., 2005) provavelmente se deu por conta da sua presença em outros tipos de câncer, como em CEs de esôfago, onde já se verificou a superexpressão do *HOXC6* em relação aos tecidos normais adjacentes (CHEN et al., 2005).

Os iniciadores utilizados nas reações deste estudo foram desenhados para amplificarem as duas variantes *HOXC6* de humanos e a de camundongo, excluindo-se, portanto qualquer possibilidade de estarmos deixando de amplificar uma variante ou outra. A amplificação do controle positivo mostra que a ausência de amplificação não foi devida a possíveis fatores ligados à reação de PCR.

Algumas amostras de tecido não tumoral adjacente utilizadas em nosso trabalho, exibiam região de submucosa contendo glândulas salivares. Apesar de as glândulas salivares não estarem no enfoque deste estudo, temos que considerar que o fato de nenhuma destas amostras terem sido positivas para os transcritos do *HOXC6*, vem de acordo com os achados de Takahashi et al. (2004), que identificaram a expressão de *HOXC6* em tecidos de órgão adultos, como glândula tireóide, cérebro, pulmão entre outros, sendo que em glândulas salivares, os transcritos estavam ausentes.

A expressão do *HOXC6* já foi observada em diversas neoplasias, como carcinomas de mama (CHARIOT et al., 1996), pulmão (TIBÉRIO et al., 1994), próstata (MILLER et al., 2003; RAMACHANDRAM et al., 2005), osteossarcoma (KLOEN et al., 1997), leucemias (BIJL et al., 1996) e linfomas (BIJL et al., 1997). O fato de o *HOXC6* estar expresso em alguns tumores e tecidos normais do adulto e estar ausente em outros, como nas amostras avaliadas neste trabalho, pode ser explicado pelo fato de

que diferentes órgãos contêm células de diferentes origens exibindo padrões característicos de expressão dos genes *HOX*. O padrão específico de expressão de genes *HOX* em órgãos adultos indica seu importante papel na identidade regional dos órgãos e na manutenção da especificidade (TAKAHASHI et al., 2004).

Diferentemente do *HOXC6*, os transcritos do *HOXA7* e do *TGIF* foram identificados nas amostras de tecidos não tumorais adjacentes e nos CEs de boca. Os resultados de RT-PCR mostraram que os transcritos do *HOXA7* estavam presentes em 70% dos casos estudados. Para o *TGIF* foi observada positividade em 80% dos casos estudados. A análise estatística não revelou probabilidade significativa de esses transcritos estarem mais presentes na neoplasia ou nos tecidos normais adjacentes. Nenhuma associação com aspectos clínicos e estadiamento pôde ser estabelecida, porém a presença desses transcritos nas amostras avaliadas sugere alguma participação na carcinogênese de boca. Também não pode ser excluída a possibilidade de que numa maior amostragem fosse encontrada relação com as variáveis clínicas.

A RT-PCR é uma técnica muito utilizada, com alta sensibilidade permitindo a identificação de pequenas quantidades de cDNA com especificidade. Porém a RT-PCR não permite avaliar a morfologia das amostras estudadas, bem como quais populações celulares estariam produzindo os transcritos. Para este tipo de análise foi utilizada outra metodologia, a hibridização *in situ*. Utilizando essa técnica foi demonstrado que os transcritos do *HOXA7* e do *TGIF* estavam localizados predominantemente nas células epiteliais.

A presença de transcritos do *HOXA7* já foi verificada em queratinócitos anteriormente. Durante o desenvolvimento da epiderme a expressão de transcritos do

HOXA7 juntamente com *HOXA4* e *HOXA5* era predominante em relação aos outros genes *HOX* (STELNICKI et al., 1998). Essa expressão exibia diferentes padrões espaciais e temporais. Esses achados, porém, não podem ser relacionados aos aqui observados, pois sabidamente os genes homeobox têm um padrão de expressão característico para os diferentes tecidos (TAKAHASHI et al., 2004).

Essa expressão característica pode ser alterada por variações locais. Os resultados observados no epitélio não tumoral adjacente mostraram sinalização variável entre as camadas do epitélio. Essas diferenças podem refletir alterações em alguns dos epitélios estudados, pois apesar de histologicamente normais, estes podem apresentar alterações genéticas. Este fato se deve provavelmente ao fenômeno de cancerização de campo que ocorre na mucosa da boca principalmente quando exposta a fatores de risco como fumo e álcool, fatores aos quais muitos dos pacientes da nossa amostra estavam expostos (CARPENTE, SILVERMAN, 2001; GERVÁSIO et al., 2001; WIGHT, OGDEN, 1998).

Em camundongos a presença marcante de transcritos do *HOXA7* em pele e principalmente em carcinomas e papilomas foi demonstrada, porém não havia superexpressão desse gene nos carcinomas em relação à pele normal, sendo sugerido que a expressão do *HOXA7* poderia estar subregulada nas células neoplásicas (CHANG et al., 1998). A presença dos transcritos do *HOXA7* principalmente em áreas mais diferenciadas dos CEs de boca avaliados no presente trabalho pode também estar refletindo uma subregulação desse gene com a progressão tumoral o que vem em acordo com o estudo de Chang et al. (1998).

A diminuição dos transcritos *HOXA7* pode estar ainda relacionada a deleções ou perda de heterozigose no cromossomo 7p, onde se localiza esse gene. Essa

aberração genética já foi relatada em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (SCULLY, FIELD, TANZAWA, 2000).

Em relação ao papel da HOXA7 nos CEs de boca, devemos considerar sua função na inibição de genes específicos de diferenciação durante a proliferação de queratinócitos (CELLE, POLAKOWSKA, 2001). Considerando este aspecto esperaríamos encontrar um aumento de expressão do HOXA7 com a progressão tumoral, porém não foi o observado nos casos analisados.

Esse fato pode ser devido a que a HOXA7 funciona como um potente repressor de transcrição, porém tem uma atuação complexa e exibe além dos domínios de repressão, domínios de ativação. Foi sugerido que dependendo do contexto celular, a HOXA7 pode ativar mais do que reprimir (SCHNABEL, ABATE-SHEN, 1996). Sabe-se ainda que a ação das proteínas HOX em geral resulta muito mais da combinação da expressão de diversos genes *HOX* do que da atividade de apenas um dominante, e que na célula, interações entre genes *HOX* com outros homeobox e ou genes externos reguladores ou efetores, já foram documentadas (CHARIOT et al., 1996; CILLO et al., 2001). Sendo assim, as características individuais de cada neoplasia que inclui suas alterações genéticas e expressão alterada de diversas proteínas podem influenciar diferentemente a ação da HOXA7 e conseqüentemente a sua expressão.

Este fato foi demonstrado em cultura de células de uma linhagem de carcinoma epidermóide, onde foi observado que a HOXA7 pode estimular o gene de diferenciação TGM1, que normalmente é reprimido pela HOXA7. Como explicação foi sugerido que a expressão de um cofator da HOXA7 estaria reprimindo seus domínios inibitórios nessa neoplasia (CELLE, POLAKOWSKA, 2001). Com base nestes aspectos podemos argumentar sobre a possibilidade de que no CE de boca a HOXA7

estaria tendo uma participação semelhante à da linhagem celular do estudo de Celle e Polakowska (2001), e a sua presença em regiões mais diferenciadas poderia estar mantendo a diferenciação das células neoplásicas por atuação conjunta de algum cofator ainda desconhecido. Já nas regiões menos diferenciadas sua ausência ou diminuição poderia estar favorecendo a proliferação. Nesse sentido a investigação da expressão de genes de diferenciação de queratinócitos em conjunto com a *HOXA7* nos CEs de boca poderia ser esclarecedora e deve ser aventada para estudos futuros.

O outro fator a ser considerado é que a ativação de receptores para EGF parece estimular a expressão de *HOXA7* (CELLE, POLAKOWSKA, 2001). A superexpressão do EGF-R em CEs de boca já foi verificada (MISHIMA, IMOUE, HAYASHI, 2002, RICHTER et al., 2005), inclusive correlacionada com o menor grau de diferenciação desta neoplasia (CHRISTENSEN et al., 1992). Sendo assim também esperaríamos um aumento na expressão do *HOXA7* nas áreas menos diferenciadas, o que não foi observado. Deve-se considerar a possibilidade de a proteína *HOXA7* estar sendo estabilizada por algum cofator ainda desconhecido e apresentar sua meia vida aumentada, como ocorre para a TGIF, e assim, apesar de haver diminuição dos transcritos *HOXA7* nas regiões menos diferenciadas, isso não significaria que a proteína *HOXA7* não estaria presente. Porém a diminuição do EGF-R em CEs de boca também já foi observada (SAKAI et al., 1990) e a diminuição dos transcritos do *HOXA7* poderia ser consequência deste evento.

O envolvimento do *HOXA7* em diversas neoplasias já foi demonstrado, estando por vezes superexpresso, como nos CEs de esôfago (CHEN et al., 2005), ou ainda perdendo sua expressão em neoplasias pouco diferenciadas como as de ovário e no

epitélio de superfície de ovários normais (NAORA et al., 2001), mostrando mais uma vez atuações distintas da HOXA7 em diferentes contextos celulares.

O mecanismo exato através do qual a HOXA7 estaria exercendo sua função nos CEs não pode ser explicado até o momento, mesmo porque os genes alvo e as funções da HOXA7 ainda são pouco conhecidos. As considerações feitas acima nos mostram diferentes possibilidades para o papel desse gene na carcinogênese oral, porém o seu real papel nesta neoplasia necessita ainda ser demonstrado.

Da mesma maneira que para o *HOXA7*, os nossos resultados sugerem envolvimento do gene *TGIF* nos CEs de boca.

O TGIF é um fator de transcrição envolvido em diversas vias de sinalização atuando como um repressor ligado ao DNA ou como um cor-repressor em associação a outras proteínas ligantes ao DNA (WOTTON et al., 2001). Foi inicialmente descoberto como competidor para o receptor do ácido retinóico, ligando-se aos elementos responsivos do mesmo (BERTOLINO et al., 1995). Subseqüentemente foi identificado como inibidor da via do TGF- β , através da interação com as proteínas Smads (CHEN et al., 2003; PESSAH et al., 2001; WOTTON et al., 1999), sendo sugerido que ele mesmo seria um alvo dessa via e estaria envolvido num controle de feedback negativo para diminuir a ação das TGF- β (CHEN et al., 2003). Além disso, foi observada uma regulação dos níveis de TGIF através da via de sinalização EGF/Ras/MAPcinase, aumentando a meia vida desta proteína o que influenciaria na sua função na via do TGF- β (LO, WOTTON, MASSAGUÉ, 2001).

A participação da TGIF nessas vias de sinalização mostra que qualquer alteração na sua expressão pode levar a muitas implicações, principalmente nos processos que envolvem a carcinogênese. Alterações na concentração de TGIF

durante o desenvolvimento embrionário já foram observadas e levam a efeitos dramáticos (GRIPP et al., 2000; CHEN et al., 2003).

Na carcinogênese o papel da TGIF ainda permanece incerto. Alguns estudos sugerem que está envolvida no desenvolvimento ou progressão neoplásica (BORLAK et al., 2005; HU et al., 2005; NAKAKUKI et al., 2002). No presente trabalho foi observado a presença de transcritos do *TGIF* no epitélio das amostras de tecido não tumoral adjacente e em CEs de boca, sendo que nos carcinomas o sinal de hibridização era mais evidente nas áreas bem diferenciadas das neoplasias. Esta diminuição dos transcritos em áreas menos diferenciadas pode estar refletindo, ou mesmo influenciando, alterações nas diversas vias de sinalização em que o TGIF está envolvido.

Nakakuki et al. (2002) verificaram que linhagens celulares de carcinomas epidermóides de esôfago exibiam amplificação gênica e superexpressão do *TGIF* e que essas linhagens eram resistentes à inibição de crescimento promovida pelo TGF- β 1. Essa resistência à ação do TGF- β 1 também foi demonstrada por Hu et al. (2005) em células de carcinomas gástrico transfectadas com TGIF. Esses autores demonstraram ainda que a expressão do TGIF poderia estar correlacionada a indução de diferenciação na linhagem celular estudada. Os achados de Hu et al. (2005) estão de acordo com os resultados do presente trabalho na medida em que o sinal de hibridização para o TGIF foi mais evidente nas regiões mais bem diferenciadas dos CEs de boca estudados.

O envolvimento da via do TGF- β em CEs de boca já foi verificado. Alguns trabalhos mostraram que a perda do receptor II do TGF- β está relacionada à invasão e a presença de metástases (ICHIJO, MOMOSE, MIYAZONO, 1990; PATERSON et al.,

2001). A expressão do próprio TGF- β é variável entre os estudos, já tendo sido demonstrada sua perda (LOGULLO et al., 2003), sua não alteração (PATERSON et al., 2001), ou sua expressão sendo relacionada à indução de invasão (HASSINA et al., 1999; LEWIS et al., 2004). A presença do TGIF em CEs de boca com diminuição nas áreas menos diferenciadas, sugere a possibilidade de outra proteína, envolvida na via de sinalização do TGF- β , estar atuando na desregulação desta via nessas neoplasias.

Considerando esta possibilidade, a falta da TGIF nas áreas menos diferenciadas resultaria na perda do seu efeito inibitório sob o TGF- β e poderia estar permitindo a ação tardia do TGF- β , o que está relacionado à progressão, invasão e metástase (AKHURST, DERYNCK, 2001; DUMONT, ARTEAGA, 2003; HASSINA et al., 1999; LEWIS et al., 2004, WAKERFILD, ROBERTS, 2002).

A diminuição dos transcritos do TGIF poderia estar relacionada à perda de heterozigose no cromossomo 18p onde este gene está localizado. Apesar de este ser considerado um evento raro para o CE de cabeça e pescoço, já foi observado nessa neoplasia (SCULLY, FIELD, TANZAWA, 2000).

A proteína TGIF pode ainda ser fosforilada e ter sua meia-vida aumentada por ação da via EGF/Ras/MAPcinase (LO, WOTTON, MASSAGUÉ, 2001). Esse evento pode permitir que os transcritos do *TGIF* estejam menos presentes nas áreas pouco diferenciadas, mas que a proteína esteja lá exercendo sua função normalmente. Sendo assim, a TGIF estaria mantendo a inibição da via do TGF- β . Essa atuação da TGIF pode ser sustentada pelo fato da desregulação da via EGF/Ras/MAPcinase estar associada à proliferação de CEs de boca (MISHIMA, IMOUE, HAYASHI., 2002).

A superexpressão do EGF-R (MISHIMA, IMOUE, HAYASHI., 2002, RICHTER et al., 2005) por vezes sendo relacionada com o menor grau de diferenciação

(CHRISTENSEN et al., 1992), e ainda a expressão nuclear de ERK1/2, que é correlacionada com metástases para linfonodos e é visualizada predominantemente nas margens invasivas da neoplasia (RICHTER et al., 2005) já foram demonstradas e podem estar atuando diretamente na estabilização da proteína TGIF principalmente nas fases mais tardias dos CEs de boca. Foi sugerido que esta estabilização da TGIF através da via EGF/Ras/MAPcinase promoveria um mecanismo para a modificação das respostas das Smads, adquirindo resistência à inibição do crescimento mediada pelo TGF- β e permitindo outras respostas como a produção de matrix extracelular, mobilidade celular e estímulo à angiogênese (LO, WOTTON, MASSAGUÉ, 2001).

A superexpressão do *TGIF* já foi associada à via do EGF em carcinomas hepáticos sendo considerada um evento precoce nessa neoplasia (BORLAK et al., 2005), porém, considerando os resultados do presente trabalho, nos carcinomas epidermóides de boca este parece ser um evento tardio, envolvido na progressão tumoral.

Outro aspecto a ser considerado em relação à expressão dos transcritos do *TGIF* nos CEs de boca, seria o seu papel como competidor para o receptor do ácido retinóico ligando-se aos elementos responsivos do mesmo (BERTOLINO et al., 1995). Os retinóides estão envolvidos na indução de apoptose levando à maturação normal das células em divisão, e assim suprimindo a carcinogênese (AMOS, LOTAN, 1991). Além disso, os retinóides diminuem a taxa de crescimento das células epiteliais e parecem atuar na prevenção de CEs segundos primários (BENNER et al., 1994) e de lesões cancerizáveis de boca (GORSKY, EPSTEIN, 2002). Podemos sugerir que a presença da proteína TGIF poderia estar inibindo as ações do ácido retinóico através da ligação a seus receptores e assim favorecendo a carcinogênese oral.

Pelo descrito acima, diversos mecanismos podem estar relacionados ao envolvimento do *TGIF* nos CES de boca. Esse trabalho demonstrou que os transcritos desse gene estão presentes nas neoplasias estudadas e que estão diminuídos em regiões menos diferenciadas. O envolvimento da TGIF nas diversas vias de sinalização que participam da carcinogênese de boca sustenta estes resultados e nos sugere uma participação desta proteína nos CEs de boca, por isso, o estudo da expressão da proteína TGIF pode ser muito elucidativo.

Deve-se salientar que o gene *TGIF* apresenta montagem (“splicing”) alternativa exibindo 8 variantes que codificam para quatro isoformas (NCBI. Locuslink *TGIF*, 2004). Cada uma das isoformas pode ter uma participação diferente, e talvez a diminuição dos transcritos possa estar relacionada a uma variante ou outra. Essa possibilidade já está sendo estudada pelo grupo.

A literatura tem mostrado um número cada vez maior de trabalhos relacionando os genes homeobox a neoplasias (GRIER et al., 2005; NUNES et al., 2003, NUNES, MATIZONKAS-ANTONIO, 2005). Zhu et al., (2004) verificaram a expressão do gene *Quox-1* em epitélio com atipia e em carcinoma epidermóide de boca. Em estudos anteriores, verificamos em CEs de boca a expressão dos genes homeobox *PITX1* (LIBÓRIO, 2004), *HOXB5* (TUCCI 2003, ALMEIDA 2004), *HOXB13* e *HHEX* (CAZAL 2004).

Neste trabalho foi demonstrada a ausência de amplificação dos transcritos do gene *HOXC6* nos CEs de boca e o envolvimento dos genes *HOXA7* e *TGIF* nessa neoplasia. Apesar de não ter sido possível associar a presença dos transcritos desses genes com aspectos clínicos das neoplasias, foi observado uma provável correlação com o grau de diferenciação histopatológica.

O grau de diferenciação histológica apenas mostra pouca correlação com o comportamento biológico da neoplasia e a resposta individual do paciente ao tratamento (WOOLGAR, 2005). A presença de marcadores biológicos que permitam estabelecer essa associação traria benefícios diretos para o doente. Nesse sentido a continuação das pesquisas com o *HOXA7* e o *TGIF* nos CEs de boca poderia trazer respostas importantes.

Os resultados apresentados em conjunto com trabalhos anteriores sugerem que a família de genes homeobox tenha algum papel na carcinogênese de boca. A perda ou ganho de expressão dos genes homeobox promove a oncogênese como uma consequência dos seus efeitos inapropriados no crescimento e diferenciação (ABATE-SHEN, 2002). A diminuição de expressão dos transcritos dos genes *HOXA7* e *TGIF* observada sugere que estes estejam envolvidos nos fenômenos que ocorrem nos CEs de boca.

7 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos sugerem que os genes *HOXA7* e *TGIF* podem estar envolvidos na carcinogênese de boca, enquanto que o gene *HOXC6* não teria participação nesse processo.
2. Foi observada uma provável correlação entre a presença de transcritos dos genes *HOXA7* e *TGIF* e o grau de diferenciação histopatológica do tumor, sugerindo que a diminuição do sinal para os transcritos desses genes seja um dos fenômenos que acontecem nos carcinomas epidermóides de boca.
3. Não foi possível associar a presença dos transcritos *HOXA7* e *TGIF* com os aspectos clínicos.

REFERÊNCIAS ¹

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

Afonja O, Smith JE, Cheng DM, Goldenberg AS, Amorosi E, Shimamoto T, et al. MEIS1 and HOXA7 genes in human acute myeloid leukemia. *Leu Res* 2000;(24): 849-55.

Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer – a double-edged sword. *T Cell Biol* 2001;11(11):44-51.

Almeida FCS. Localização dos transcritos dos genes WNT5A e HOXB5 em carcinomas epidermóides de boca através da técnica de hibridização "in situ". [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

Amos B, Lotan R. Retinoid sensitive cells and cells line. *Methods Enzymol* 1991;(190):217–25.

Arias AM. Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell* 2001;105(4):425-31.

Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(6):738-47.

Benner SE, Pajak TF, Lippman SM, Earley C, Hong WK. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: long-term follow-up. *J Natl Cancer Inst* 1994;(86):140–41.

---

¹ De acordo com o estilo Vancouver. Abreviaturas de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 1995;270(52):31178-88.

Bijl JJ, Oostveen JWV, Kreike M, Rieger E, Raaij-Helmar LMHV, Wallboomers JMM et al. Expression of HOXC4, HOXC5 and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* 1996;87(5):1737-45.

Bijl JJ, Oostveen JWV, Wallboomers JMM, Horstman A, Van Den Brule AJC, Willenze R, et al. HOXC4, HOXC5 and HOXC6 expression in non-hodgkin's lymphoma: Preferential expression of HOXC5 gene in primary cutaneous anaplastic T-cell and oro-gastrointestinal tract mucosa-associated B-cell lymphomas. *Blood* 1997;90(10):4116-25.

Boersma CJC, Bloemen M, Hendriks JMA, Berkel EAT, Olijve W, Zoelen EJJ. Homeobox proteins as signal transduction intermediates in regulation of NCAM expression by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osteoblast-like cells. *Molec Cell Biol Res Commun* 1999;(1):117-24.

Borlak J, Meier T, Halter R, Spanel R, Spanel-Borowski K. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumors. *Oncogene* 2005;(24):1809-19.

Caldas C, Aparicio S. Cell memory and cancer – the history of the trithorax and polycomb group genes. *Cancer Metastasis Rev* 1999;(18):313-29.

Calvo KR, Sykes DB, Pasillas MP, Kamps MP. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 2002;21(27):4247-56.

Calvo R, West J, Franklin W, Erickson P, Bemis L, Li E et al. Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer. *PNAS* 2000;97(23):12776-781.

Carpenter WM, Silverman S. Oral cancer: The role of dentist in prevention and early detection. *Dent Today* 2001;20(5):92-6.

Cazal C. Estudo da expressão dos genes HOXB13 e HHEX em carcinomas epidermóides de boca através das técnicas de RT-PCR e Hibridização in situ. [Tese de Doutorado]; Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

Celle PTL, Polakowska RR. Human Homeobox HOXA7 regulates keratinocyte Transglutaminase type 1 and inhibits differentiation. *J Biol Chem* 2001;(276):32844-53.

Chang PY, Kozono T, Chida K, Kuroki T, Huh N. Differential expression of hox genes in multistage carcinogenesis of mouse skin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;(248):749-52.

Chariot A, Castronovo V, Gillet PLC, Sobel ME, Gielen, J. Cloning and expression of a new HOXC6 transcript encoding a repressing protein. *Biochem J* 1996;(319):91-7.

Chariot A, Gielen J. Molecules in focus. The HOXC6 homeodomain-containing proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;(30):651-5.

Chen F, Ogawa K, Nagarajan RP, Zhang M, Kuang C, Chen Y. Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor- β . *Biochem J* 2003;(371):257-63.

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.

Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL, Albeck H, Hansen GN, Bretlau P. Epidermal growth factor receptor expression on oral mucosa dysplastic epithelia and squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992;249(5):243-7.

Cillo C, Barba P, Freschi G, Buciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. Hox gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer* 1992;(51):892-7

Cillo C, Cantile M, Mortarini R, Barba P, Parmiani G, Anichini A. Differential patterns of HOX gene expression are associated with specific integrin and ICAM profiles in clonal populations isolated from a single human melanoma metastasis. *Int J Cancer* 1996;(66):692-7.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 2001;(1998):161-9.

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

Dumont N, Arteaga CL. Targeting the TGF β signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell* 2003;(3):531-6.

Egan SE, Weinberg RA. The pathway to signal achievement. *Nature* 1993;365(6449):781-3.

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

Gehring WJ, Muller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Qian YQ, et al. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet* 1990;6(10):323-9.

Gervásio OLAS, Dutra RA, Tartaglia SMA, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MCF. Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Bras Dent J* 2001;12(1):57-61.

Ginos MA, Page PP, Michalowics BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research* 2004;(64):55-63.

Gorsky M, Epstein JB. The effect of retinoids on premalignant oral lesions. *Cancer* 2002;95(6):1258-64.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 2005;(205):154–71.

Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link nodal signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* 2000;(25):513-21.

Gudas LJ. Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth Diff* 1992;(3):655–62.

Hassina R, Matsumoto-Taniura N, Kato I, Sakuda M, Nakamura T. Autocrine and paracrine motility factors and their involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line. *Brit J Cancer* 1999;80(11):1708-17.

Hayashi K, Yokozaki H, Naka K, Yasui W, Lotan R, Tahara E. Overexpression of retinoic acid receptor β induces growth arrest and apoptosis in oral cancer cell lines. *Cancer Res* 2001;(92):42-50.

Hombria JC, Lovegrove B. Beyond homeosis - HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 2003;71(8):461-76.

Hu Z, Wen J, Xiao D, Zhen H, Fu C. Effects of transforming growth interacting factor on biological behaviors of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005;11(1):84-8.

Ichijo H, Momose F, Miyazono K. Biological effects and binding properties of transforming growth factor- β on human oral squamous cell carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1990;(187):263-9.

INCA - Instituto nacional do câncer .Brasil. Ministério da saúde. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br> [2005 Out. 25].

Jeon GA, Lee J, Patel V, Gutkind JS, Thorgeirsson SS, Kim EC, et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004;(112):249-58.

Jones A. A general review of the p53 gene and oral squamous cell carcinoma. *Ann R Australias Coll Dent Surg* 1998;(4):66-9.

Jones FS, Holst BD, Minowa O, Robertis EMD, Edelman GM. Binding and transcriptional of the promoter for the neural cell adhesion molecule by HoxC6 (Hox-3.3). *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;(90):6557-61.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999;(13):687-98.

Kawagoe H, Kawagoe R, Sano K. Targeted down-regulation of MLL-AF9 with antisense oligodeoxynucleotide reduces the expression of the HOXA7 and -A10 genes and induces apoptosis in a human leukemia cell line, THP-1. *Leukemia* 2001;15(11):1743-9.

Kim MS, Li SL, Bertolami CN. State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. *Anticancer Res* 1993;13(5):1405-13.

Kloen P, Visker MHPW, Olijve W, Zoelen EJJV, Boersma CJC. Cell-type-specific modulation of Hox gene expression by members of the TGF- β superfamily: A comparasion between human osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Biochem Bioph Res Comm* 1997;(233):365-9.

Langston AW, Thompson JR, Gudas LJ. Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the Hox A and Hox B Homeobox Gene Clusters. *J Biol Chem* 1997;272(4):2167-75.

Largey JS, Meltzer SJ, Sauk JJ. Loss of heterozygosity involving APC gene in squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77(3):260.

Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF et al. Tumor-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Brit J Cancer* 2004; (90):822-32.

Libório TNS. Transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca: amplificação por RT-PCR e localização por hibridização in situ. [Dissertação de Mestrado]; Faculdade de odontologia da USP;2004.

Lo R, Wotton D, Massagué J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the smad transcriotional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20(1):128-36.

Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, Kowalski LP, Nishimoto IN, Pasini FS, et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J Oral Pathol Med* 2003;32(3):139-45.

Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42(4):559-68.

Marshall H., Morrison A., Studer M., Pöpperl H, Kruinlauf R. Retinoids and hox genes. *FASEB J* 1996;(10):969-78.

Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, et al. Aberrant *HOXC* Expression Accompanies the Malignant Phenotype in Human Prostate. *Cancer Res* 2003;(63):5879–88.

Minucci S, Ozato K. Retinoid receptors in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Devel* 1996;(6):567-74.

Mishima K, Inoue K, Hayashi Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002;(38):468-74.

Muro-Cacho CA, Rosário-Ortiz K, Livingston S, Muños-Antonia T. Defective transforming growth factor β signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by lack of expression of activated smad2. *Clin Cancer Res* 2001;(7):1618-26.

Murray A, Hunt T. *The cell cycle*, New York: Oxford University Press, 1993. 245p.

Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M et al. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23(1):19-24.

Naora H, Montz FJ, Chai C, Roden RBS. Aberrant expression of homeobox gene *HOXA7* is associated with mullerian-like differentiation of epithelial of ovarian tumors and the generation of a specific autologous antibody response. *Proc Natl acad Sci USA* 2001;98(26):15209-14.

NCBI. LocusLink *HOXA7*. Disponível em: URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/Loc.Rpt.cgi?1=3204 [2004 ago. 8].

NCBI. LocusLink HOXC6. Disponível em: URL:
www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=3223 [2004 ago. 8].

NCBI. LocusLink TGIF. Disponível em: URL:
www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=7050 [2004 ago. 8].

Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 2001;128(7):1019-31.

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

Nunes FD, Matizonkas-Antonio LF. Genes homeobox e sua participação no câncer de boca: implicações e perspectivas. *Amb Hosp* 2005;17(174):18-22.

Partridge M, Green MR, Langdon LD, Feldmann M. Production of TGF- β by cultured keratinocytes, skin and oral squamous cell carcinomas-potential autocrine regulation of normal and malignant epithelial cell proliferation. *Br J Câncer* 1989;60(4):542-8.

Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK et al. Decrease expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001;(193):458-67.

Pellerin I, Schnabel C, catron K, Abate C. Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on hox cluster. *Mol Cell Biol* 1994;14(7):4532-45.

PEREIRA JCR. Análise de dados qualitativos. São Paulo, EDUSP, 1999

Pessah M, Prunier C, Marais J, Ferrand N, Mazars A, Lallemand F, et al. C-Jun interacts with corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress smad2 transcriptional activity. *PNAS* 2001;98(11):6198-6203.

Pindborg JJ, Jolst O, Renstrup G, Roed-Petersen B. Studies on oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *J Am Dent Assoc* 1968;(76):767–71.

Ramachandran S, Liu P, Young AN, Yin-Goen Q, Lim SD, Laycock N et al. Loss of HOXC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2005;(24):188–98.

Raman V, Martensen SA, Reisman D. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 2000;(405):974–8.

Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? *Mol Carcinog* 1993;7(3):139-46

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.

Richter p, Bohmer FD, Hindermann W, Borsi L, Hyckel P, Schleier P et al. Analysis of activated EGFR signalling pathways and their relation to laminin-5 γ 2 chain expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Histochem Cell Biol* 2005;(124):151-60.

Rivero ERC. Perda de heterozigose dos genes p53, dcc e apc em carcinomas epidermóides de boca. [Tese de doutorado]; Faculdade de odontologia da USP;2003.

Rodrigues VC, Moss SM, Tuomainen H. Oral cancer in UK: to screen or not to screen. *Oral Oncol* 1998;(34):454-65.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1021-54.

Sakai H, Kawano K, Okamura k, Hashimoto N. Immunohistochemical localization of c-myc oncogene product and EGF receptor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 1990;19(1):1-4.

Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005;34(3):129-33.

Schnabel CA, Abate-Shen C. Repression by HoxA7 is mediated by the homeodomain and the modulatory action of its N-terminal-arm residues. *Molec Cell Biol* 1996;(16):2678-88.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma2: chromossomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;(36):311-27.

Silverman SJ, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;(53):563–8.

Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto Jr. 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):379-84.

Stelnicki EJ, Komuves LJ, Kwong AO, Holmes D, Klein P, Rosenfeld S et al. HOX homeobox genes exhibit spatial and temporal changes in expression during human skin development. *J Invest dermatol* 1998;110(2):110-5.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Experimental Cell Res* 2004:144-53.

Tiberio C, Barba P, Magli MC, Arvelo F, Le Chevalier T, Poupon MF et al. HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1994;58(4):608-15.

Tucci R. Expressão do RNA mensageiro do gene HOXB5: relação com a classificação TNM e graduação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides de boca. [Tese de Doutorado]; faculdade de odontologia da USP;2003.

Vider BZ, Zimmer A, Hirsch D, et al. Human colorectal carcinogenesis is associated with deregulation of homeobox gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;(232):742–8.

Vieira S. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro: Campus, 3ª ed. 1998

Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Gen Dev* 2002;(12):22-9.

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by alcohol may influence the development of oral cancer – a review. *Oral Oncol* 1998;34(6):441-7.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; article in press.

Wotton D, Lo RS, Swaby LC, Massagué J. Multiples modes of repression by the smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 1999;274(52):37105-10.

Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, Massagué J. The smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth & Differ* 2001;(12):457-63.

Wu DK, Oh SH. Sensory organ generation in the chick inner ear. *J Neurosci* 1996;16(20):6454-62.

Zhu F, Li J, Li W, Liu Z, Long X. Overexpression and Clinicopathological Significance of Homeobox Gene Quox-1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Jof Biochem Molec Biol* 2004;37(6):671-5.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D.A.
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL 3691
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 n° 566/01, intitulado: "Estudo da expressão de genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca", apresentado pelo(a) pesquisador(c) 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 n° 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

ANEXO B – Relação dos casos estudados com suas características clínicas

Caso	RDT	QT	Fumo	Álcool	Idade	Sexo	Cor	Local	Dif Hist	UICC	TNM	Tam (cm)	Esp (cm)	Inv vasc	Inv neu	Inv adj	Marg comp
1	+	+		-	55	F	B	Bord. LÍng.	BD	III	T2N1M0	2,3	0,7	-	+	-	-
2	+	+	+	+	50	M	B	Bord. LÍng.	MD	III	PT2N1M0	4	1,2	-	+	-	*
3	+	+	+	+	70	F	B	Bord. LÍng.	MD	IV	PT1N2AM0	0,9	0,3	-	-	-	*
4	+	+	+	NC	87	M	P	Maxila	MD	IV	T4N0M0	5,3	2	-	-	+	+
5	-	-	-	-	77	M	B	Lábio inf.	MD	IV	T4N0M0	3,5	1,2	-	-	-	-
6	+	+	+	+	60	M	B	Soalho	MD	IV	T4N3M0	7	4	+	+	+	-
7	-	-	-	-	68	M	B	Lábio inf.	BD	II	PT2N0M0	2,5	1,3	-	-	-	*
8	-	-	+	-	78	F	B	Bord. LÍng.	BD	I	T1N0M0	NC	0,2	-	-	-	*
9	+	NC	+	+	50	M	B	Mento	BD	IV	T4N0M0	3,2	0,9	-	+	-	-
10	+	-	-	-	50	M	B	Língua	BD	I	T1N0M0	1,5	0,6	-	-	-	*
11	+	+	+	+	56	F	B	Base LÍng.	MD	IV	T4N0M0	1,3	1,1	-	+	+	*
12	+	-	+	+	67	M	B	Língua	MD	II	PT2N0M0	2,5	2,2	-	+	-	-
13	NC	NC	NC	NC	80	M	B	Língua	MD	IV	T4N0M0	3,7	1,2	-	-	+	-
14	NC	NC	+	-	49	F	B	Base LÍng.	IND	IV	T4N3M0	3,7	1,8	NC	NC	+	NC
15	+	+	-	-	19	M	B	Língua	MD	IV	T4N2M0	NC	NC	NC	NC	NC	NC
16	-	-	-	-	38	F	A	Língua	BD	II	T2N0M0	1,4	0,6	-	-	-	*
17	+	+	+	+	62	M	B	Bord. LÍng.	MD	IV	T4NXM0	9	1,2	-	+	+	-
18	+	+	-	-	17	F	B	Trígono	NC	IV	T4N0M0	NC	NC	NC	NC	NC	NC
19	+	+	+	+	50	M	B	Língua	IND	IV	T4N1M0	1	1,5	-	+	NC	+
20	NC	NC	NC	NC	56	F	B	Língua	MD	NC	T2N1M0	2	0,2	+	-	+	NC

RDT = Radioterapia; QT = quimioterapia; + = presente; - = ausente; NC = não consta; * = livre após ampliação das margens; F = feminino; M = masculino; B = branca; P = preta; A = amarela; BD = bem diferenciado; MD = moderadamente diferenciado; IND = indiferenciado; TNM = parâmetro de classificação tumoral onde T é tamanho, N é presença de linfonodos metastáticos e M é presença de metástase à distância; UICC = Union Internationale Contre le Câncer onde pacientes são divididos em precoces (Estádios I e II) e avançados (III, IV); Tam = tamanho; Esp = espessura; inv = invasão; vasc = vascular; neu = neural; adj = adjacente; marg comp = margem comprometida. .