TATIANA NAYARA LIBÓRIO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO DE VARIANTES TRANSCRICIONAIS DO GENE
HOMEBOX TGIF1 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

São Paulo

2008

Tatiana Nayara Libório dos Santos

**Expressão de variantes transcricionais do gene Homeobox TGIF1
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 Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2008

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Libório dos Santos, Tatiana Nayara

Expressão de variantes transcricionais do gene Homeobox
TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca / Tatiana Nayara
Libório dos Santos; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São
Paulo, 2008.

133p. : fig., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Genes Homeobox 2. Carcinoma epidermóide de boca 3.
Patologia bucal

CDD 617.63

BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR
QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA,
DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Libório dos Santos TN. Expressão de variantes transcricionais do gene homeobox TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, __/__/2008.

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

Aos meus pais, Joaquim e Maria, pelo amor incondicional, incentivo, conselhos e presença marcante em todos os momentos da minha vida. Eu **AMO** vocês da maneira mais forte e bela que existe.

Aos meus queridos irmãos Juliana, Luciana e Rodrigo pela amizade, união e amor sempre compartilhados.

Ao meu namorado Ariano Arias pelas palavras carinhosas, companheirismo, amizade e apoio nesses últimos momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes** pelos conhecimentos adquiridos desde o mestrado, ao longo desses últimos cinco anos. Agradeço a disponibilidade para orientação, a oportunidade de desenvolver este trabalho e aos conselhos sempre recebidos para o meu amadurecimento profissional.

Aos eternos professores titulares, **Profa Dra Vera Cavalcanti de Araújo** e **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo** pela oportunidade, desde o mestrado, de ingressar na Disciplina de Patologia Bucal, dando-me a oportunidade de mais este aprendizado. Apesar de não serem mais parte do quadro atual da disciplina, serão sempre exemplos de sabedoria e competência a serem perseguidos.

Às professoras titulares **Profa Dra Suzana C. Orsini Machado de Sousa**, **Profa Dra Marina Helena C. G. de Magalhães**, pela oportunidade de dar seguimento aos estudos na Pós-Graduação, pela receptividade e pelo exemplo de organização.

A todos os professores da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, **Profa Dra Marília Trierveiler Martins**, **Profa. Dra Karen Lopes Ortega** e **Profa Dra Andréa Mantesso** pelo convívio, disponibilidade, ensinamentos e integração com todos os alunos da pós-graduação.

Ao meu chefe **Prof MsC. Jeconias Câmara**, chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Agradeço pela orientação e acolhida desde a iniciação científica e por me apoiar sempre na carreira docente.

Ao **Prof MsC. Jeconias Câmara**, mais uma vez, e a **Profa Neila Falconi**, agradeço pela confiança depositada, pelo infinito estímulo para realizar pós-graduação na FOU SP e, sobretudo, pelo suporte total durante meu afastamento de cinco anos da disciplina.

A todos os professores do DPML da UFAM principalmente, **Prof. Dr. Luís Carlos de Lima Ferreira**, **Prof. Dr. Dirceu Benedicto Ferreira** e **Profa Ms. Luciana Fujimoto Botinelli**, responsáveis pela disciplina de patologia médica, por todo apoio, incentivo e amizade sempre recebida.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, Diretor do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer AC. Camargo de São Paulo e responsável interno por este projeto, pela abertura e parceria de pesquisa com a Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

À **Dra Dirce Maria Carraro**, Pesquisadora do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer em São Paulo, e colaboradora direta deste trabalho. Agradeço pela contribuição científica e disponibilidade em direcionar várias etapas desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, Professor titular de Patologia Geral da FOU SP e Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C. Camargo, por me guiar “no caminho das pedras” no início desse

trabalho e no primeiro contato com sua instituição. Agradeço também pela constante receptividade em contribuir com a disciplina de Patologia Bucal da FOU SP na revisão de lâminas de doenças hematológicas.

A **Louise Mota**, funcionária do Instituto Ludwig, pela preparação das alíquotas de RNA solicitadas, por toda atenção no fornecimento de dados técnicos sobre esse material e pela ajuda no manuseio do PINGA (sistema de buscas). Aos funcionários do SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatística) do Hospital Ac Camargo, representados pela **dona Hirdes, Íris, Douglas, Ruth, Luciano**, e outros, pela presteza na liberação dos prontuários e microfilmes para pesquisa. A **Gilmara**, da Anatomia Patológica do hospital, pela ajuda na procura de laudos antigos no banco de dados da Patologia.

A **Dra. Maria das Graças da Silva-Valenzuela**, pessoa de grande importância no meu aprendizado laboratorial. Apesar de não estar mais conosco fisicamente no laboratório, agradeço pela troca de conhecimentos, pela amizade e pela continuação no esclarecimento de dúvidas desde o mestrado até os dias de hoje.

A **Dra. Luciana Matizonkas-Antonio** pela amizade e incentivo nesse trabalho, o qual representa um aprofundamento de sua tese de doutorado.

As amigas **Camila Rodini** e **Flávia Caló de Aquino**, companheiras do laboratório de Patologia Molecular da FOU SP, pela amizade, pelos conselhos e pela presença constante desde o início do doutorado. A amiga **Flávia Caló**, agradeço também a ajuda imprescindível na realização das reações de imunoistoquímica.

A todos os amigos que trabalham no laboratório de Patologia Molecular, em especial, **Thaís Acquafreda, Patrícia Adashi, Fábio Coracin, Ricardo Shié e Márcia Campos**, pelo convívio, respeito, troca de conhecimentos e amizade nesses últimos anos.

A todos os amigos da Patologia Bucal que tive o prazer de conviver **Serginho, Paulo Braz, Karen Hiraki, Natalie Pepe, Helder e Flávia Pontes, Sérgio Cury, Tessa, Renata Acay, Paulo Santos, Marina, Yonara, Alexandre Fraige, Fernandinha, Bruno, Kívia, Érica, Luciana, Alexandra, Aluana, Alexandre Medeiros, Juliana, Roberto, Cristiane Barbosa, Fabiana, Márcio e Aline**, pela amizade e convivência harmoniosa.

A todas as funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Edna (*in memorium*), Zilda, Néia, Nair, Patrícia, Elisa, Bia e Débora** pelo convívio e pela presteza sempre que foi preciso.

Ao apoio financeiro recebido da **Universidade Federal do Amazonas** e do **Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PICDT)**, indispensáveis para minha estadia em São Paulo para cursar Patologia Bucal.

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

Ao **Laboratório de Epidemiologia e Estatística (Lee)** do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese, representado por **Daniela Parreira**, pela realização das análises estatísticas referentes a esse trabalho. Agradeço também a ajuda de **Carolina Baltazar** pela revisão referente ao português de grande parte da tese.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no mestrado e doutorado da FOUSP.

Há um universo de mistérios à nossa volta
e me anima a possibilidade da surpresa.

Emílio Ribas (1862-1925)

Libório dos Santos TN. Expressão de variantes transcricionais do gene homeobox TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Genes da família homeobox têm sido alvo de intensas pesquisas científicas relacionadas ao câncer. Recentemente, mostramos que o gene homeobox TGIF1 está expresso no carcinoma epidermóide de boca na sua forma genérica. Porém, não foi feita uma discriminação entre quais variantes transcricionais, ou “subtipos”, do TGIF1 estariam expressas. Neste estudo, propusemo-nos a verificar diferenças na frequência de expressão das variantes transcricionais do TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca (CEB) em relação a tecidos morfológicamente não tumorais (TN), avaliar possíveis associações entre essas variantes nos pacientes portadores de CEB e relacionar o grau de expressão dessas variantes com aspectos clínicos, histológicos e com a sobrevida dos pacientes. Adicionalmente, procuramos analisar a expressão da proteína do TGIF1. Foram analisadas 48 amostras congeladas de CEB e 12 de TN. O RNA total de cada amostra foi extraído utilizando-se solução de TRizol®. Os transcritos do TGIF1 foram amplificados por RT-PCR para cada caso de CEB e TN utilizando-se inicialmente um par de iniciadores genéricos para todas as suas variantes. Após essa triagem, os casos positivos foram amplificados utilizando-se pares de iniciadores específicos para cada variante. Não houve diferença estatística entre a frequência de expressão das variantes do TGIF1 nos grupos CEB e TN, porém as variantes 4 e 8 foram as que apresentaram p-valores menores. Dentro do grupo de CEB, houve associação significativa entre algumas

variantes entre si (sete dos vinte e um cruzamentos), de forma que as variantes 1 e 4 foram as que mais tiveram associação com outras variantes. Dessa forma, optamos por prosseguir o estudo utilizando somente as variantes 1, 4 e 8. Não houve correlação entre a expressão das variantes selecionadas e variáveis clínicas e histológicas propostas. Em relação à sobrevida, a expressão das variantes 1 e 8 mostraram correlação univariada com o desfecho óbito, de maneira que o grupo de indivíduos que mais expressou ambas as variantes foi o que apresentou menor risco de óbito. Através da análise multivariada das variantes 1 e 8 e aspectos clínicos e histológicos, somente o tamanho da lesão e a invasão vascular sanguínea tiveram significado estatístico. A expressão protéica do TGIF1 foi analisada em 46 amostras parafinadas considerando-se a diferenciação celular, a graduação imunoistoquímica e o compartimento celular. Os resultados obtidos mostraram que as variantes do TGIF1 estão expressas diferentemente no grupo dos pacientes com CEB e sugere-se que a expressão das variantes 1 e 8 estejam relacionadas, de maneira semelhante, a um menor risco de óbito para pacientes portadores de CEB. Adicionalmente, sugere-se que o tamanho da lesão e a invasão vascular sanguínea representem fatores de risco relevantes para o óbito de pacientes portadores de CEB. Sugere-se também que a expressão simultânea da proteína do TGIF1 tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula esteja correlacionada a lesões pobremente diferenciadas.

Palavras-Chave: Genes Homeobox; Processamento Alternativo; Carcinoma Epidermóide de boca; Reação em Cadeia da Polimerase via transcriptase reversa RT-PCR; Imunoistoquímica IHQ

Libório dos Santos TN. Expression of transcript variants of the homeobox gene TGIF1 in oral squamous cell carcinoma [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Genes of the homeobox family have been the subject of intense scientific research related to cancer. Recently, we show that this gene is expressed in oral squamous cell carcinoma in its generic form. However, it was not made a discrimination between which transcript variants, or "subtypes", of TGIF1 were expressed. In this study, we aim to verify differences in the expression of the eight transcript variants described for the homeobox gene TGIF1 in oral squamous cell carcinomas (OSCC) related with morphologically non-tumoral tissues (NT), evaluate possible associations between these variants in patients with OSCC and relate the degree of expression of these variants with clinical, histological and survival aspects of patients. Additionally, we analyzed the expression of TGIF1 protein. It was analyzed 48 frozen samples of OSCC and 12 of NT. The total RNA from each sample was extracted using TRizol solution. TGIF1 transcripts were first amplified by RT-PCR for each case of OSCC and NT using a generic pair of primers. After these screening, the positive cases were amplified using specific pair of primers for each variant. There was no statistical difference between the frequency of expression of TGIF1 transcript variants in OSCC and NT groups, but the variants 4 and 8 had the lowest p-values. Within the OSCC group, there was a significant association between some variants among themselves (seven of the twenty-one associations), in a way that the variants 1 and 4 were the ones that had most association with other variants. Thus, we chose to continue the

study using only variants 1, 4 and 8. There was no correlation between the expression of the selected variants with the clinical and histological aspects. Regarding survival, the expression of variants 1 and 8 showed statistical correlation with the outcome death, in a way that the group of patients that most expressed both variants was that one with the lower risk of death. By multivariate analysis of variants 1 and 8 and clinical and histological aspects, only the size of the lesion and vascular invasion blood were statistically significant. The protein expression of TGIF1 was analyzed in 46 paraffin-embedded tissues considering the cell differentiation, the immunohistochemistry graduation and the cell compartment. The results showed that the variants of TGIF1 are differently expressed in the OSCC group of patients and it is suggested that the expression of variants 1 and 8 may be related, in a similar way, to a lower risk of death for patients with OSCC. Additionally, it is suggested that the size of the lesion and the vascular invasion of blood represent relevant risk factors for death in patients with OSCC. It is also suggested that the simultaneous expression of TGIF1 protein not only in the nucleus but also in the cytoplasm of the cell is correlated with the poorly differentiated lesions of OSCC.

Keywords: Homeobox Genes; Alternative Splicing; Squamous Cell Carcinoma; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR; Immunohistochemistry IHC

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Homeodomínio, mostrando a região da terceira hélice interagindo no sulco maior do DNA	34
Figura 2.2 – Esquema alternativo de regulação da atividade de algumas homeoproteínas. M: modificações pós traducionais; GTF: fator de crescimento geral, do inglês “general transcription factor”	35
Figura 2.3 – Expressão colinear dos genes homeobox agrupados (HOX) em <i>Drosophila melanogaster</i> e embrião de camundongo	37
Figura 2.4 – Genes a montante dos genes homeóticos da mosca da fruta <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Figura 2.5 – Mecanismo de <i>splicing</i> alternativo.....	48
Figura 4.1 – Regiões N e C-terminais das variantes do gene TGIF1 (Gene ID:7050). A região C-terminal é comum a todas variantes. A diferenciação entre elas ocorre através da sua região N-terminal	64
Figura 4.2 – Sequência dos iniciadores da variante 2. A sequência anti senso (forward) mostrada no sentido 5’3’possui 23 nucleotídeos (nt) (100 ao 122). A sequência senso (reverse), sentido 3’5’possui 19 nt (511-493). O tamanho do produto amplificado pelo par de iniciadores é de 412 pares de base (pb). Ao lado de cada iniciador é mostrada a TM (temperatura de melting), na qual ocorre associação dos iniciadores a fita molde de cDNA.....	62
Figura 4.3 – Esquema da variante transcricional 1 do gene TGIF1, mostrando a sequência dos iniciadores e a região interexon a ser amplificada	65
Figura 4.4 – Esquema da variante transcricional 2 do gene TGIF1, mostrando a sequência iniciadores e a região interexon a ser amplificada	66
Figura 5.1- Exemplo de cromatograma contendo parte do transcrito da var4 do TGIF1 enviado para sequenciamento. O mesmo procedimento foi realizado para as outras variantes	78

Figura 5.2- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação do GAPDH nos casos 1 a 7 de CEB. C-= controle negativo; C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de bases	79
Figura 5.3- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação do HPRT nos casos 1 a 7 de CEB. C-= controle negativo; C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de bases	79
Figura 5.4- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação da var3,4 nos casos 26 a 31. C-= controle negativo; C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de bases	79
Figura 5.5- Proporção de detectados (sim) e não detectados (não) da var4 nos grupos de CEB e TN	81
Figura 5.6- Associação entre as variantes 1 e 4, dentro do grupo de CEB. Não: não detectados pela var1; Sim: detectados pela var1. Em azul: não detectados pela var4 dentro da var1. Em verde: detectados pela var4 dentro da var1	82
Figura 5.7- Expressão da proteína do TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca. (A) HE de mucosa de língua exibindo transição neoplásica (B) IHQ em corte pareado de (A) exibindo área de expressão da proteína em todas as camadas do epitélio. (C) HE da mesma lesão e (D) corte pareado de (C) exibindo marcação da proteína no núcleo e citoplasma da célula. (E) HE de mucosa de assoalho de boca e (F) IHQ em corte pareado de (E) exibindo marcação da proteína, sobretudo no núcleo da célula. (G) HE de mucosa de assoalho de boca e (H) IHQ em corte pareado de (G) exibindo marcação da proteína do TGIF1, sobretudo no citoplasma da célula. HE 100X (A) e 200X (C, E, G). Streptavidina-Biotina, 100X (B) e 200X (D, F, H)	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Sequência dos iniciadores em relação ao gene, ao número de acesso no Gene Bank, ao sentido e ao tamanho do produto	63
Tabela 4.2- Reagentes utilizados para as reações de PCR com suas respectivas concentrações num tubo contendo 25 µl de solução	67
Tabela 5.1- Proporção de detectados e não detectados de todas as variantes nos grupos de CEB e TN. Em negrito os resultados que deram p-valores mais baixos	80
Tabela 5.2- Proporção de detectados e não detectados da var4 nos grupos de CEB e TN.....	80
Tabela 5.3- Relação entre as variantes que tiveram associação significativa dentro do grupo de CEB.....	81
Tabela 5.4- Associação entre as vars 1 e 4, dentro do grupo de CEB.....	81
Tabela 5.5- Variantes selecionadas e o resultado do teste do Qui-Quadrado em relação aos dados clínicos e histológicos dos pacientes com CEB. Em negrito os resultados que deram p-valores mais baixos	82
Tabela 5.6- Sobrevivência média categorizada para cada variável. Em negrito, estão as variáveis que deram significância pelo teste de <i>log-rank</i> ($p \leq 0,10$). IC- intervalo de confiança. E.P- erro padrão	84
Tabela 5.7- Resultado da regressão de Cox. E.P- erro padrão, Sig- significância, Exp (B)- exponencial de beta, IC- intervalo de confiança	86
Tabela 5.8- Variáveis que não continuaram no modelo	86

Tabela 5.9- Resultado das associações entre a expressão da proteína do TGIF1 e as variáveis de interesse. Em negrito estão os casos com significância estatística ou com valores aproximados. Grad-graduação imunoistoquímica, dif. histol- diferenciação histológica, N- núcleo, C- citoplasma 90

Tabela 5.10- Associação da expressão protéica do TGIF1, considerando-se a diferenciação histológica e o compartimento celular 91

Tabela 5.11- Associação da expressão protéica do TGIF1, considerando-se a diferenciação histológica e o citoplasma exclusivamente 91

Tabela 5.12- Associação da expressão protéica do TGIF1, considerando-se a graduação imunoistoquímica e o núcleo exclusivamente 91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Distribuição do câncer bucal segundo o sexo e a década de vida	75
Gráfico 5.2: Distribuição do câncer bucal segundo a localização e o envolvimento de linfonodos	76
Gráfico 5.3: Distribuição do câncer bucal segundo o tamanho e estadiamento patológico	76
Gráfico 5.4: Distribuição do câncer bucal segundo diferenciação histológica e invasão perineural.....	77
Gráfico 5.5: Distribuição do câncer bucal segundo invasões vasculares sanguíneas e linfáticas	77
Gráfico 5.6- Curvas de Kaplan-Meier, mostrando maior sobrevida para o grupo que expressou a var1 (média 62 meses) e conseqüentemente menor risco de óbito para esse grupo em relação ao grupo que não expressou essa variante (média 38 meses). O teste de <i>log-rank</i> aplicado deu valor de 0,0769. 1- expressou e 0- não expressou.....	85
Gráfico 5.7- Curvas de Kaplan-Meier, mostrando maior sobrevida para o grupo que expressou a var8 (média 68 meses) e conseqüentemente menor risco de óbito para esse grupo em relação ao grupo que não expressou essa variante (média 44 meses). O teste de <i>log-rank</i> aplicado deu valor de 0,0958. 1- expressou e 0- não expressou.....	85
Gráfico 5.8- Modelo de Cox para tamanho da lesão e invasão vascular sanguínea. O grupo T3/T4 (tamanho maior que 4 cm) apresenta maior risco de óbito em relação ao grupo T1/T2. O grupo que apresentou IVS apresenta maior risco de óbito em relação ao grupo sem essa característica.....	86
Gráfico 5.9- Teste <i>log-minus-log</i> de proporcionalidade para PT	87

Gráfico 5.10- Distribuição câncer bucal segundo diferenciação histológica e graduação imunoistoquímica da marcação com o anticorpo TGIF1.... 88

Gráfico 5.11- Expressão da proteína do TGIF1 segundo o compartimento celular (núcleo e/ou citoplasma) 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
°C	graus Celsius
aa	aminoácidos
AJCC	American Joint Committee on Cancer
cDNA	do Inglês “complementary desoxyribonucleid acid”
CDX1	do Inglês “caudal type homeobox1”
Dlx	gene distal-less da <i>Drosophila</i>
DNA	do Inglês “desoxyribonucleid acid”
Dntp	deoxinucleotídeos trifosfato
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	do Inglês “epidermal growth factor”
EMX	do inglês “empty spiracles”
FGF	do inglês “fibroblast growth factor” ou fator de crescimento fibroblástico
FKHR	gene forkhead.
GAPDH	do Inglês “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”
HOM-C	complexo homeótico da <i>Drosophila</i>
HOX	genes HOX (homeobox agrupados)
HPRT	do Inglês “hypoxantine phosphoridrosyl transferase”
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	kilobases, corresponde a 1000 pb

MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
mRNA	do Inglês “messenger ribonucleid acid”
MSX	do Inglês “muscle segmente homeobox”
NCBI	do inglês “National Center for Biotechnology Information”
Ng	nanograma
OTX	gene humano homólogo ao gene Otx (“orthodenticle”) da <i>Drosophila</i>
PAX	gene humano homólogo ao gene Pax (“paired”) da <i>Drosophila</i>
Pb	pares de base
PCR	do Inglês “polimerase chain reaction”
PDX1	do Inglês “pancreatic and duodenal homeobox 1”
pH	potencial de hidrogênio
PITX1	do Inglês “paired-like homeodomain transcription factor 1”
PROX1	do Inglês “prospero homeobox 1”
PTEN	do Inglês “phosphatase and tensin homolog”
Quox-1	do Inglês “quail homeobox-containing gene”
ras	do Inglês “rat sarcoma virus”, proto-oncogene e proteína ras
RNA	do Inglês “ribonucleid acid” ou ácido ribonucléico
Rpm	rotações por minuto
RT-PCR	do Inglês “transcriptase chain reaction”
Shh	do Inglês “Sonic hedgehog”, proteína
TA	temperatura ambiente
TAE	tris-acetato EDTA
TGF-beta	do Inglês “transforming growth factor”

TNM	estadiamento TNM, T= tumor; N= linfonodos e M= metástases a distância.
UICC	do Francês "Union internationale Contre Le Cancer"
UVB	raios ultra-violetas B

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Carcinoma epidermóide de boca	27
2.1.1 Aspectos moleculares	29
2.1.2 Aspectos prognósticos	31
2.2 Fisiologia dos genes homeobox	33
2.3 Ligação molecular entre desenvolvimento e carcinogênese	39
2.3.1 Genes homeobox <i>versus</i> carcinoma epidermóide de boca	44
2.4 Splicing alternativo	45
2.4.1 Bases gerais do splicing	46
2.4.2 Splicing alternativo propriamente dito	47
2.4.3 Splicing alternativo <i>versus</i> câncer	49
2.5 Caracterização do gene homeobox TGIF1	50
2.5.1 Aspectos funcionais e vias de sinalização conhecidas	51
2.5.2 TGIF1 <i>versus</i> câncer	54
3 PROPOSIÇÃO	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Critérios utilizados	57
4.2 Casuística	57
4.3 Dados dos pacientes	58
4.4 Obtenção do RNA total	59
4.5 Confeção do cDNA ou transcrição reversa (RT – Reverse Transcriptase)	59
4.6 Desenho dos iniciadores	60

4.7 PCR (Polimerase Chain Reaction)	65
4.7.1 Análise dos resultados e análise estatística das variantes do TGIF1.....	68
4.8 Análise da expressão da proteína do TGIF1	71
4.8.1 Técnica imunoistoquímica (IHQ)	71
4.8.2 Análise dos resultados e análise estatística das reações de IHQ	74
5 RESULTADOS	75
5.1 Caracterização das amostras	75
5.2 Expressão das variantes transcricionais do TGIF1	77
5.2.1 Análise estatística da expressão das variantes do TGIF1.....	79
5.3 Expressão da proteína do TGIF1	87
5.3.1 Análise estatística das reações de IHQ.....	90
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de boca é uma lesão agressiva e fatal que representa em média 95% das neoplasias malignas que acometem a mucosa da boca. Infelizmente, seu perfil genético é obscuro o que tem consequências para o tratamento.

A oncogênese foi relacionada por vários pesquisadores com o desenvolvimento embrionário, já que ambos os processos são dependentes, de forma diferente, da proliferação e diferenciação celular. Nesse aspecto, genes de desenvolvimento embrionário, como os da família homeobox, aparecem como alvos interessantes de pesquisas científicas. O gene TGIF1, membro dos homeobox, já foi relacionado a alguns tipos de cânceres em humanos, incluindo órgãos sólidos (como esôfago, estômago e fígado) e órgãos não sólidos (como leucemias). Em câncer de boca existem somente dois artigos científicos publicados associando membros da família homeobox a esse tipo de lesão.

Propusemo-nos inicialmente a estudar o gene homeobox TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca tendo por base o fato de transcritos desse gene terem sido encontrados durante o Projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço” conduzido pelo Instituto Ludwig de São Paulo, em 2001. Posteriormente, através dos dados desse projeto, nossa equipe identificou transcritos desse gene em amostras específicas de carcinomas epidermóides de boca (MATIZONKAS-ANTONIO, 2005).

No entanto, nesse estudo, a expressão desse gene foi avaliada na sua forma genérica, não se levando em consideração as suas diferentes variantes transcricionais (vars) resultantes de seu processamento alternativo (usaremos o

termo *splicing* alternativo) e é possível que algumas dessas variantes sejam mais relevantes que outras para a carcinogênese oral. Dessa forma, surge a pergunta: existe alguma variante do TGIF1 que tenha relevante expressão em carcinomas epidermóides de boca?

A importância do *splicing* alternativo deve-se ao fato de que variantes específicas derivadas desse processo podem estar associadas a determinados tipos de cânceres em diferentes estágios da lesão, podendo servir como marcadores diagnósticos e prognósticos.

Dessa maneira, nosso objetivo é verificar diferenças de expressão das oito variantes transcricionais descritas para o gene homeobox TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca (CEB) em relação a tecidos morfológicamente não tumorais (TN), avaliar também possíveis associações entre essas variantes nos pacientes portadores de CEB e, por fim, relacionar o grau de expressão dessas variantes com aspectos clínicos, histológicos e com a sobrevida dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

O carcinoma epidermóide de boca (CEB), também denominado de carcinoma espinocelular, carcinoma de células escamosas e carcinoma escamocelular, é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento. Mundialmente, o câncer de boca é considerado o sexto mais freqüente, com variações regionais de incidência e mortalidade, sendo o carcinoma epidermóide responsável por aproximadamente 95% do total de casos (BRASIL, 2002; JOHNSON, 1991; MOORE; JOHNSON; PIERCE, 2000).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas no Brasil para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>).

Em relação ao câncer de boca as estimativas apontam 14.160 casos novos no Brasil, sendo 10.380 no sexo masculino e 3.780 no sexo feminino. Dessa forma, o câncer de boca deverá ser considerado a quinta neoplasia mais freqüente em homens e a sétima mais freqüente em mulheres. A região sudeste seria responsável

em média por 56,6% de todos os casos de câncer de boca no país, com estimativas de 8010 casos novos (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>).

Apesar de alguns centros relatarem uma modesta melhora no curso da lesão durante os últimos 20 anos, o câncer de boca continua evoluindo com prognóstico desfavorável em relação à sobrevida de cinco anos e tempo livre de doença, estimados em 56% e 58% respectivamente. (KADEMANI et al., 2005; PATEL; SHAH, 2003).

O perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide de boca está representado principalmente por homens, acima dos 40 anos de idade, cujos locais mais acometidos são língua, assoalho bucal e lábio inferior (BRENER et al., 2007). As metástases envolvem principalmente os linfonodos cervicais superiores e mais tardiamente, pulmão, ossos e fígado (BRANDÃO; CAVALHEIRO; SONDERMANN, 2000).

Os fatores predisponentes mais aceitos para a etiologia do carcinoma epidermóide de boca são o hábito de fumar tabaco e o de ingerir bebidas alcoólicas. O tabaco, no entanto, representa o principal fator carcinogênico e sua ação é potencializada pela ingestão de álcool (MAGALHÃES; MAGALHÃES, 2000). Vários estudos indicam que a detecção de HPV parece estar freqüentemente aumentada em epitélios orais displásicos e carcinomatosos em relação ao epitélio de mucosa oral normal, porém o papel real do HPV na carcinogênese oral ainda é controverso na literatura (MILLER; JOHNSTONE, 2001).

O câncer de lábio possui uma etiopatogênese peculiar, associada à exposição aos raios ultravioletas tipo B (UVB), ocorrendo, sobretudo, no lábio inferior devido à localização mais acessível para essa radiação. Outros fatores menos evidentes como carências nutricionais, uso do chimarrão, dentre outros, têm sido associados

com o câncer de boca (NEVILLE et al., 1998; MAGALHÃES; MAGALHÃES, 2000), porém, são ainda controversos.

O carcinoma epidermóide de boca possui uma apresentação clínica diversificada, incluindo desde lesões ulceradas e infiltrativas a exofíticas. Outras lesões menos sugestivas podem ocorrer sob a forma de placas brancas ou áreas eritematosas, ou mesmo uma mistura de ambas, o que torna o diagnóstico diferencial dessas lesões de extrema importância (BIRMAN; SUGAYA, 2000).

O recurso diagnóstico de rotina utilizado é o exame histopatológico, o qual é obtido através de biópsia e se destina a analisar a morfologia tecidual. Atualmente estudos moleculares e imunoistoquímicos, associados aos dados histopatológicos e clínicos, têm contribuído para caracterização dos diversos eventos envolvidos no processo de carcinogênese, e visam também encontrar marcadores específicos que possam trazer contribuições não somente para o diagnóstico, como também para o prognóstico e terapêutica (MITTELDORF, 2000).

2.1.1 Aspectos moleculares

No carcinoma epidermóide de boca ainda não há um perfil genético estabelecido. Vários estudos já identificaram anormalidades genéticas presentes em cânceres de boca e de cabeça e pescoço de maneira geral, porém a importância dessas descobertas ainda não está clara. Existem evidências do envolvimento de alterações genéticas presentes nesses cânceres, em ordem de frequência, nos

cromossomos 9, 3, 17, 13 e 11, além de outras regiões cromossômicas (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). Devido ao fato dessas regiões possuírem genes supressores tumorais, como FHIT, localizado no cromossomo 3p14 e p16, localizado no cromossomo 9p21, é muito provável que deleções ocorridas nessas regiões cromossômicas acarretem transformações malignas (MAO et al., 1996; SABBAGA, 2000).

A reativação da telomerase, prolongando o tempo de vida da célula e possibilitando o acúmulo de múltiplas alterações genéticas parece ser um processo importante na etapa inicial da carcinogênese de cabeça e pescoço (CALIFANO et al., 1996). A amplificação gênica e a superexpressão protéica também parecem estar associadas. O gene da ciclina D1, por exemplo, está freqüentemente amplificado e superexpresso em estágios precoces da carcinogênese de cabeça e pescoço (IZZU et al., 2003). A expressão aberrante da ciclina D1 também está relacionada à deleção do p16 (UZAWA et al., 2007). O receptor de EGF (EGFR, geralmente superexpresso) também tem sido considerado como potencial alvo de intervenção terapêutica em carcinomas de cabeça e pescoço (POMERANTZ; GRANDIS, 2003).

Muitos genes já foram associados ao câncer de boca, incluindo oncogenes Ras (H-ras, K-ras e N-ras), myc, c-erbB, erbB-2 e alguns localizados no braço longo do cromossomo 11, tais como bcl-1, PRAD-1, int-2, hst-1, EMS1 (DAS; MAJUNDER; DASGUPTA, 2000; NEVILLE et al., 1998; SABBAGA, 2000). Outros potenciais marcadores são as E-caderinas (NEVILLE et al., 1998) e PTEN (SQUARIZE, CASTILHO; PINTO JR, 2002). O clássico supressor tumoral p53 geralmente está mutado em 50% dos casos (BRENNAN et al., 1995), porém a interpretação definitiva de todos esses achados ainda é ponto de debate na literatura.

ARORA et al. (2005) identificaram vários genes diferencialmente expressos em CEBs, incluindo componentes do sistema imune, sinalização e estrutura celular, angiogênese, proliferação, apoptose, adesão e metabolismo celular. Porém, o ponto alto do estudo foi a superexpressão da proteína 14-3-3-zeta (envolvida em sinalização celular) em doze de quinze CEBs analisados.

Mais recentemente foi relatado que a ativação da via do Akt, correlacionada à expressão de E-caderina, representa um importante indicador prognóstico para o CEB, de forma que sua inibição seria uma possível abordagem terapêutica para essas lesões (LIM et al., 2007).

Atualmente, há uma tendência progressiva em associar genes responsáveis pelo desenvolvimento com a gênese de neoplasias malignas, em função de ambos os processos compartilharem mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação da célula, como ciclo celular e apoptose. Dentre os vários marcadores estudados atualmente, destacamos aqueles pertencentes à família dos homeobox.

2.1.2 Aspectos prognósticos

O conhecimento dos fatores prognósticos do câncer é fundamental não apenas para o planejamento terapêutico adequado, mas também para oferecer ao paciente e seus familiares uma avaliação da situação e das perspectivas para controle da doença. De maneira geral, a sobrevida do paciente com câncer de boca é modificada de acordo com o estadiamento da doença. Quando a doença é local, a

sobrevida é de 79%, na doença locoregional é de 42% e na presença de metástases distantes é de 19% (GLOECKER, 1994).

Os sistemas TNM clínico e TNM patológico (pTNM) servem para descrever a extensão anatômica da doença, de maneira que, quanto maior a classificação do estágio, pior o prognóstico para o paciente (UICC, 1992). A classificação adotada pela UICC (Union Internationale Contre le Cancer) e pela AJCC (American Joint Committee on Câncer - 1997) são as mais seguras e aceitas pela comunidade científica.

As características histológicas, como grau de diferenciação celular, espessura do tumor e invasões locais são relatados como possíveis fatores prognósticos. Alguns autores tentaram definir fatores prognósticos relevantes para o câncer de boca. Segundo Neville et al. (1998), o tamanho do tumor e a extensão da expansão metastática são os melhores indicadores prognósticos do paciente. Já Yuen et al. (2000) compararam o significado prognóstico do diâmetro, comprimento, largura, espessura, área e volume tumoral com características clínico-patológicas em carcinomas orais de língua. De todos os parâmetros analisados por esses autores, a espessura do tumor foi o único fator significativo de avaliação prognóstica com relação à recorrência local, metástase linfonodal e sobrevida dos pacientes.

Porém, o fator de prognóstico mais importante no câncer de boca parecem ser as metástases regionais (envolvimento de linfonodos cervicais) o que torna esse diagnóstico fundamental para o planejamento do tratamento, no entanto os fatores que influenciam essa ocorrência ainda precisam ser esclarecidos (RUSSOLO et al., 2002; SHARA et al., 1984; WOOLGAR; SCOTT, 1995). A identificação de metástase regional é realizada através do exame físico e de exames complementares, porém vale ressaltar que cerca de 20 a 35% dos diagnósticos realizados são falso-

negativos do ponto de vista clínico, justificando o tratamento preventivo do pescoço (RUSSOLO et al., 2002; SHARA et al., 1984).

Quando o tumor primário é tratado exclusivamente, na vigência de uma metástase cervical oculta, há sensível redução na sobrevida dos pacientes, de maneira que a seleção de pacientes para esvaziamento cervical é realizada através de características clínicas do tumor, como seu tamanho e localização (RUSSOLO et al., 2002).

Aspectos biológicos e moleculares do tumor estão sendo pesquisados, especialmente na tentativa de identificar pacientes com risco aumentado de desenvolver metástase regional e, dessa forma, refinar o diagnóstico, predizer a sobrevida e as chances de cura dos pacientes e, finalmente, melhorar a acurácia terapêutica (RUSSOLO et al., 2002; MOHIT-TABATABAI, 1986). Atualmente com o desenvolvimento de tecnologias sofisticadas de biologia celular e molecular, a possibilidade de se encontrar marcadores biológicos relevantes para o câncer de boca está cada vez mais próxima.

2.2 Fisiologia dos genes homeobox

Os genes homeobox são conhecidos como genes controladores do desenvolvimento e importantes para a evolução dos organismos, pois atuam no topo de hierarquias genéticas regulando aspectos essenciais da embriogênese, morfogênese e diferenciação celular de uma série de organismos dos mais simples aos mais complexos. Esses genes são assim chamados por possuírem um segmento de DNA característico (o homeobox) constituído de 180 pares de base

(pb) e que codifica uma proteína com 60 aminoácidos (aa) a qual tem função de fator de transcrição e interage com genes alvos promovendo sua ativação, repressão ou mesmo modulação, o que está na dependência do sinal recebido pela célula (MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997; NUNES et al., 2003). Essa porção protéica de 60 aa, chamada de homeodomínio, possui estrutura de hélice-volta-hélice e se caracteriza pela similaridade na sequência de aa, pela especificidade ao DNA, representada pela sua terceira hélice, e pelos padrões de expressão durante o desenvolvimento animal. (figura 2.1). (EDELMAN; JONES, 1993).

Fonte: Abate-Shen, 2002

Figura 2.1 – Homeodomínio, mostrando a região da terceira hélice interagindo no sulco maior do DNA

Pouco se sabe sobre os genes alvos das homeoproteínas codificadas pelos homeobox. Sugere-se que essas homeoproteínas atuem em genes que codificam moléculas de adesão, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (CARÉ et al., 1996; LAWRENCE et al., 1996). Abate-Shen (2002) relatou que algumas dessas homeoproteínas, tais como a Otx2, podem sofrer modificações pós-traducionais e interações com outras proteínas antes de atuarem como fatores de transcrição específicos (figura 2.2).

Fonte: Abate-Shen, 2002

Figura 2.2 – Esquema alternativo de regulação da atividade de algumas homeoproteínas. M: modificações pós-traduccionais; GTF: fator de transcrição geral, do inglês “general transcription factor”

Evidências indicam que os retinóides, moléculas relacionadas à vitamina A, funcionam como importantes moléculas regulatórias do crescimento e diferenciação celular, tanto durante a embriogênese quanto no animal adulto, e são também citados como um dos prováveis reguladores da expressão de genes homeobox. A característica principal dessa regulação parece ser sua habilidade de ativar genes homeobox específicos, de maneira que a concentração do ácido retinóico, pela qual a célula é exposta, provavelmente tem influência em que tipo de gene homeobox será ativado. Além disso, essa ativação parece ocorrer em padrão colinear para os genes HOX (GUDAS, 1994).

O ácido fólico, por ser uma vitamina envolvida em um grande número de processos bioquímicos essenciais para a vida, também tem importante papel na oncologia, principalmente a partir da sua ação na metilação do DNA e na síntese de purinas e pirimidinas. Causas genéticas ou de deficiência desta vitamina tem sido relacionadas ao câncer em vários estudos e seu papel se estende e se prolonga desde a prevenção até o tratamento do câncer. No entanto, estudos mais recentes demonstram que esse composto parece ter função dupla no desenvolvimento do

câncer, de maneira que, na carcinogênese inicial pode conferir proteção, sobretudo em pacientes com baixos níveis de folato, enquanto que, se administrado tardiamente e em altas concentrações, pode promover o câncer (ULRICH, 2007).

A descoberta dos genes homeobox forneceu uma ferramenta importante para o entendimento do desenvolvimento e evolução, cujo controle genético é universal, já que foram encontrados com função semelhante em várias espécies, de fungos e vegetais a humanos (GEHRING, 1998). O nome homeobox foi dado a esse grupo de genes porque foram descobertos por serem importantes para o fenômeno conhecido como homeose, quando sofrem mutação, na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. A homeose consiste na transformação de uma estrutura corporal em outra. Um exemplo típico ocorre quando da mutação do gene Antennapedia, que acarreta a formação de patas no lugar de antenas.

Em condições normais, os genes homeóticos especificam o eixo antero-posterior da *Drosophila*, contribuindo fortemente para a correta localização de suas estruturas corporais (DE ROBERTIS; OLIVER; WRIGHT, 1990; GEHRING, 1998). Sabe-se que nos vertebrados os genes homólogos ao complexo homeótico da *Drosophila* (HOM-C) estão dispostos de maneira agrupada e são chamados de HOX. Em humanos estão representados por 39 membros dispostos em quatro grupos (A, B, C e D), localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2, respectivamente, e contém 9 a 11 genes em cada um desses grupos. A expressão dos genes HOX é iniciada na gastrulação e segue um padrão de colinearidade temporal e espacial, ou seja, os genes HOX da região 3' são expressos precocemente, seguidos progressivamente pelos genes da região 5', que são expressos mais tardiamente e controlam regiões mais posteriores do embrião (figura 2.3).(CILLO et al., 1999; GOODMAN, 2002).

Fonte: <http://www.lcusc.net/lchs/mewoldsen/homeobox.gif>

Figura 2.3 – Expressão colinear dos genes homeobox agrupados (HOX) em *Drosophila melanogaster* e embrião de camundongo

A seqüência homeobox também foi encontrada em genes não homeóticos da *Drosophila* e que parecem estar a montante da sua cascata de sinalização. Tais genes representam a classe dos homeobox não agrupados, pois estão dispersos pelo genoma. Nesse caso, vários genes como os de efeito materno, os “gap”, os “pair-rule” e os genes de polaridade de segmento podem conter a seqüência homeobox (GILBERT, 2000) (figura 2.4). Vários genes homeobox não agrupados continuam sendo descobertos, porém os mais conhecidos e estudados atualmente são os genes Pax, Msx, Emx, Otx e Dlx assim chamados devido à homologia com os genes da *Drosophila* “paired”, “muscle segment homeobox”, “empty spiracles”, “orthodenticle” e “distal-less”, respectivamente (CILLO et al., 1999; THOMAS et al., 2000).

Figura 2.4 – Genes a montante dos genes homeóticos da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*

Durante o desenvolvimento os genes homeobox MSX estão expressos em tecidos que estão sofrendo interações epitélio-mesenquimais podendo ser induzidos por fatores de crescimento, como BMP e FGFs (CILLO et al., 1999). Os genes PAX estão, em humanos, representados por 9 genes e têm demonstrado expressão restrita no aspecto temporal e espacial do desenvolvimento (EPSTEIN et al., 1994). Esses genes estão expressos, sobretudo, no sistema nervoso central, mesoderma paraxial e seus derivados, e também participam do desenvolvimento dos olhos e trato urogenital (CILLO et al., 1999; ECCLES et al., 2002; WAWERSIK; MAAS, 2000). Membros da família Dlx, juntamente com membros da família Msx regulam o desenvolvimento e mineralização de tecidos, incluindo ossos, cartilagem e dente (CILLO et al., 1999; THOMAS et al., 2000). Genes que controlam o desenvolvimento do cérebro incluem TGIF1, Otx1 e 2 e Emx1 e 2 (BONCINELLI, 1997; CILLO et al., 1999; QIU et al., 1996; MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997, CHEN et al., 2003, GRIPP et al., 2000). O PITX1 é um importante gene envolvido no desenvolvimento das

estruturas anteriores, em particular, glândula pituitária, cérebro e face (LANCTÔT; GAUTHIER; DROUIN, 1999).

2.3 Ligação molecular entre desenvolvimento e carcinogênese

Genes da família homeobox estão sendo progressivamente associados a cânceres em humanos, pois se mostram desregulados em uma gama de neoplasias malignas, incluindo aquelas de pele, cólon, próstata, mama, ovário, rim, pulmão, tireóide, esôfago, além de leucemias (ANBAZHAGAN; RAMAN, 1997; BONCINELLI, 1997; CILLO et al., 2001; FORD, 1998; LAWRENCE et al., 1996; NUNES et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2007). De maneira geral, as conseqüências dos genes homeobox para o processo de carcinogênese podem ser interpretadas como uma extensão de sua função normal (ABATE-SHEN, 2002). Falaremos a seguir, de forma breve, sobre a participação de genes homeobox em algumas neoplasias. Essa participação, no entanto, é mais encontrada na literatura associada com os genes HOX, ou seja, com os genes homeobox agrupados, apesar de alguns membros da família de genes não agrupados terem uma associação com a carcinogênese efetivamente mais consistente.

A família de genes PAX representa, dentro dos homeobox, aquela cuja associação com o câncer está mais bem estabelecida. Essa família possui nove genes todos expressos no sistema nervoso central, mesoderma paraxial e seus derivados. Esses genes apresentam um domínio comum de ligação ao DNA, o paired box (CILLO et al., 1999), no entanto nem todos os seus membros são da

família homeobox, já que alguns deles não possuem a região do homeodomínio em suas proteínas. Maulbecker e Gruss (1993) estudaram o potencial oncogênico de genes Pax, demonstrando que esses genes eram capazes de induzir oncogênese em camundongos ao atuarem como proto-oncogenes. Essa indução era dependente do domínio paired funcional e não necessitava da presença do homeodomínio para essa atuação. Dessa forma, não somente as proteínas Pax3 e Pax6, que além de possuírem o domínio paired, possuem também homeodomínio, como também Pax2 e Pax8 que contém apenas homeodomínios residuais e o Pax1, que não possui homeodomínio, foram capazes de induzir tumorigênese em camundongos. Além disso, é relatado que rabdomiossarcomas alveolares geralmente apresentam translocações cromossômicas envolvendo os genes PAX e FKHR (forkhead gene) de maneira que a fusão PAX7-FKHR (10-20% dos casos) está relacionada a um prognóstico mais favorável em comparação a translocação mais comum PAX3-FKHR (60-70% dos casos) (SORENSEN et al., 2002).

O gene não agrupado PROX1 parece estar freqüentemente inativado em carcinomas do sistema biliar por meio de deleções genômicas e silenciamento epigenético (LAERM et al., 2007). Para tumores primários de pulmão, transcritos do gene PITX1 foram encontrados subexpressos quando comparados com tecidos pulmonares normais. Adicionalmente, uma associação entre a falta de expressão desse gene e um maior grau de diferenciação foi observada (CHEN et al., 2007).

O estudo de Gidekel et al. (2003) evidencia um gene homeobox normalmente importante para diferenciação de um tecido específico tendo papel causal na carcinogênese desse mesmo tecido se expresso no tempo, nos níveis e no contexto errado. Nesse estudo, os autores mostraram que Oct-4 (também conhecido como Oct-3 e POU5f1), um membro não agrupado da família dos homeobox, está

expresso em vários tumores do testículo, incluindo carcinomas embrionários, seminomas, tumores de células germinativas mistas e neoplasias de células germinativas intratubulares. Em condições normais, Oct-4 é restrito a células germinativas e é necessário para sua pluripotencialidade, porém pode causar tumores testiculares caso sua expressão seja reativada nessas mesmas células que já sofreram maturação.

Em relação a órgãos não sólidos, homeoproteínas do gene MSX e a cascata de sinalização Ras já foram associadas a leucemias (TAKAHASHI et al., 1997). De maneira geral, os trabalhos sobre homeobox não agrupados estão associados a anormalidades e síndromes diversas (QIU et al., 1996; WUYTS et al., 2000).

Em relação à participação de genes homeobox agrupados em neoplasias malignas, Guazzi et al. (1998) relataram interações regulatórias positivas entre as proteínas humanas dos genes homeobox HOXB1, HOXB2 e HOXB3 e um fragmento de DNA do gene Otx2 localizado a sua montante em carcinomas de células embrionárias e sugeriram que essas proteínas poderiam desempenhar papel importante no refinamento da expressão precoce do gene Otx2 *in vivo*.

Foi proposto que fatores de crescimento representam alvos normais da ativação de genes HOX durante a embriogênese. Exemplo típico ocorre em melanomas, onde a hiperexpressão do HOXB7 ativa constitutivamente o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), favorecendo a proliferação celular descontrolada (CARÉ et al., 1996). O gene HOXB7 mostrou-se também expresso em câncer de mama e nesse caso foi associado com mal prognóstico (HYNDMAN et al., 2002). Mais recentemente o HOXB7 foi relacionado ao reparo de DNA tanto *in vitro* quanto *in vivo*, representando o primeiro gene HOX na literatura relacionado com esse tipo de função (RUBIN et al., 2007).

Chang et al. (1998) estudaram a amplificação de transcritos de genes Hox, tanto na pele normal de camundongos adultos como em papilomas e carcinomas, através do uso de iniciadores degenerados. Seus resultados mostraram que 25 dos 39 genes Hox conhecidos foram amplificados no tecido normal. Ao contrário, nos papilomas e carcinomas, houve isolamento preferencial de clones do HoxA7 e HoxB7 com concomitante silenciamento de todo o locus do grupo HoxD, sugerindo que a maioria dos membros do grupo Hox estão expressos na pele normal de camundongos, enquanto seu repertório é substancialmente limitado em papilomas e carcinomas.

Rieger et al. (1994) observaram que a expressão do gene HOXC4 em queratinócitos de pele normal e em tumores de pele estava correlacionada com a diferenciação celular. Utilizando RT-PCR e hibridização *in situ*, os autores encontraram expressão predominante do gene em queratinócitos diferenciados, ao passo que em células mais indiferenciadas o gene mostrava-se com baixa expressão.

Takahashi et al. (2004), através da comparação de tecidos tireoidianos normais e linhagens celulares de câncer de tireóide mostraram alteração na expressão de alguns genes HOX de maneira órgão-específica, especialmente para aqueles da família Abd-B, que se mostraram mais desregulados nesse tipo de neoplasia que os outros genes Hox. Um recente estudo em carcinoma de esôfago mostrou níveis de expressão significativamente elevados em 24 dos 39 genes HOX e nos genes CDX1, CDX2 e PDX1 em comparação a mucosa normal. Além disso, reações imunoistoquímicas mostram que as proteínas HOXA5 e D9 estavam mais presentes no citoplasma dessas lesões do que em mucosa normal (TAKAHASHI et al., 2007).

Anormalidades em genes homeobox também estão relacionadas à carcinogênese via anomalias congênitas. Nesse caso, mutações nos genes Hoxa4, Hoxa5 e Hoxa6 em camundongos transgênicos estão relacionadas ao surgimento de anormalidades esqueléticas que levam à transformação da sétima vértebra cervical em um par de costelas que lembram a primeira vértebra torácica. Essa alteração, similar a conhecida costela cervical em humanos, é vista em aproximadamente 2 a 6% dos indivíduos e está associada à formação de diversos tumores em crianças, incluindo, neuroblastomas, nefroblastomas e leucemias. A expressão gênica desses tumores também inclui os mesmos genes relacionados à costela cervical (Hoxa4, Hoxa5 e Hoxa6) (ANBAZHAGAN; RAMAN, 1997).

Em adição a expressão desregulada de genes homeobox em tumores sólidos, alguns desses genes estão freqüentemente translocados em órgãos não sólidos, como leucemias. Nesse caso, fusões de proteínas do “nucleo pore complex 98” (NUP98) com proteínas codificadas por genes homeobox foram encontradas atuando em leucemias, como por exemplo, NUP98/HOXA9, NUP98/HOXD13 e NUP98/PMX1, associadas com t(7;11), t(2;11) e t(1;11) respectivamente, (DASH; GILLILAND, 2001; NAKAMURA et al., 1999).

Apesar dos trabalhos sobre genes homeobox agrupados (HOX) relacionados ao câncer ultrapassarem aqueles de homeobox não grupados, não está evidente se esse dado reflete um significado particular na carcinogênese ou se apenas representa o fato desses genes estarem sendo estudados mais extensivamente (ABATE-SHEN, 2002).

2.3.1 Genes homeobox *versus* carcinoma epidermóide de boca

Na literatura existem apenas dois artigos científicos recentemente publicados relacionando genes homeobox e carcinogênese oral. Um deles, realizado por Zhu et al. (2004), avaliou a expressão de transcritos do gene homeobox Quox-1 e sua respectiva proteína em mucosa normal, epitélio displásico e lesões de carcinoma epidermóide de boca. Os resultados obtidos nesse estudo revelaram que o Quox-1 não estava expresso em epitélio normal, porém sua positividade aumentava progressivamente durante a progressão da displasia. Além disso, sua expressão não foi significativamente diferente em displasia avançada e CEB altamente diferenciado, mas à medida que ocorria uma redução da diferenciação, havia um aumento da expressão do Quox-1.

O outro estudo, realizado por Hassam et al. (2006), analisou os 39 HOX em mucosa normal, displasia e CEBs. Nesse estudo foram encontrados 18 genes superexpressos (HOXA1, A2, A3, A5, A9, B3, B6, B7, B9, C4, C8, C9, C11, C13, D9, D10 e D11) em comparação à mucosa normal. O gene HOXA2, A3, B3 e D10 também estavam superexpressos nas lesões de displasia oral em relação à mucosa normal, porém nenhuma diferença foi observada entre a displasia oral e o CEB, enquanto HOXA1, B7, B9 e C8 tiveram expressão diminuída em CEB quando comparadas à mucosa normal.

Partindo de dados obtidos durante o Projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço” (Instituto Ludwig de São Paulo, Brasil), foram realizados, em nosso laboratório, estudos recentes analisando, entre outros genes homeobox, o TGIF1 por meio de amplificação por RT-PCR e localização tecidual por hibridização *in situ*

(ISH) usando sonda não radioativa de mRNA em amostras de CEB e TN. Transcritos desse gene mostraram uma provável relação com o grau de diferenciação histopatológica. (MATIZONKAS-ANTONIO, 2005).

Os genes homeobox também deverão ser avaliados em CEBs através de varreduras realizadas por novas tecnologias, como microarray, realizadas por diversos grupos integrados de pesquisa em câncer. Nesse aspecto, o Laboratório de Patologia Molecular da FOUSP participa, atualmente, do projeto Gencapo (Genoma de Cabeça e Pescoço). Dessa maneira, estima-se que alguns dos genes encontrados hiperexpressos por meio de microarray com 55.000 genes da plataforma *CodeLink*TM, sejam validados por PCR em tempo real e por ISH, objetivando também encontrar marcadores de agressividade para essas lesões.

2.4 Splicing alternativo

O perfil genético da célula e suas funções básicas estão relacionados à expressão gênica. Durante muitos anos, acreditava-se que a modulação da expressão gênica era restrita ou pelo menos relacionada, em sua maioria, ao controle da transcrição. A descoberta dos processos de splicing iniciou uma nova etapa científica, ampliando os conhecimentos ao seu respeito. De maneira geral, a expressão gênica requer a integração e coordenação não só dos processos de transcrição, mas também dos processos de splicing, poliadenilação, exportação núcleo-citoplasmática e tradução dos mRNAs. Daremos uma breve explanação

sobre o mecanismo geral do splicing (ou processamento do pre-mRNA) antes de falarmos do processo de splicing alternativo propriamente dito.

2.4.1 Bases gerais do splicing

Apesar da natureza química da reação de splicing ser simples, baseada em duas reações de trans-esterificações, sua execução nas células em um contexto biológico é extremamente complexa (FERREIRA et al., 2007). O splicing do pre-mRNA é um processo essencial e precisamente regulado que ocorre após a transcrição gênica e antes da tradução do mRNA. Essa reação é efetuada pelo spliceossoma, uma maquinaria nuclear sofisticada envolvendo cinco tipos de pequenas ribonucleoproteínas (snRNP) e centenas de proteínas auxiliares que cuidam da excisão dos introns e junções dos exons repetidamente. Porém, o reconhecimento dos exons não é um processo trivial devido a três motivos: 1) os exons são relativamente pequenos quando comparados aos introns, 2) os sítios de splicing são pouco conservados e 3) os introns contêm um grande número de seqüências que lembram os sítios de splicing. A identificação do sítio de splicing é possível através da identificação de dinucleotídeos intrônicos conservados nos limites intron-exon 5'(sítio doador) e 3'(sítio aceptor). Além desses sítios básicos, existem outros bem próximos ou mais distantes, tais como os potencializadores de splicing intrônicos e exônicos (ESEs/ISEs), que promovem o reconhecimento do exon, e os silenciadores de splicing intrônicos e exônicos (ESS/ISS), que inibem o reconhecimento do sítio de splicing. A regulação e seleção desses sítios geralmente

é feita por proteínas SR (Serine/Arginine-residue proteins) que interagem diretamente com proteínas associadas às snRNP, facilitando a formação do spliceossoma (BRINKMAN, 2004; SREBROW; KORNBLIHTT, 2006).

2.4.2 Splicing alternativo propriamente dito

Quando os introns foram descobertos, imaginava-se que cada gene sempre dava origem ao mesmo mRNA. Essa idéia mostrou-se incorreta no início da década de 80 quando se constatou o processo de splicing alternativo que significa a formação, a partir de pre-mRNAs de diferentes variantes de mRNA oriundas de um mesmo gene com conseqüente produção de proteínas potencialmente diferentes, propiciando a diversidade de proteínas codificadas (EARLY et al., 1980, STAMM et al., 2005) (figura 2.5.). Dessa maneira, recentes análises genômicas indicam que 40-60% dos genes humanos realizam esse processo, sugerindo que o splicing alternativo é um dos componentes mais significativos da complexidade funcional do genoma humano, portanto representando mais a regra que a exceção (LANDER et al., 2001, MODREK; LEE, 2002; STAMM et al., 2005).

Fonte: <http://www.ercolebiotech.com/images/SlideD.gif>

Figura 2.5- Mecanismo de *splicing* alternativo

O fenômeno de *splicing* alternativo explica, em parte, o paradoxo entre o pequeno número de genes em comparação a imensa complexidade funcional genômica. Primeiramente, o sequenciamento do genoma humano levantou algumas questões a esse respeito. Na época, foi estimado que o genoma humano contivesse em média 150.000 genes, com base em etiquetas de sequência de expressão (EST), porém foram encontrados por volta de 32.000 genes em humanos (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001). Essa imensa disparidade indicou que o número de mRNAs formados era muito maior que o número de genes, sugerindo um papel crucial do *splicing* alternativo na complexidade funcional do organismo.

A complexidade que envolve o reconhecimento do sítio de *splicing* alternativo está ligada a múltiplos níveis de regulação, cada nível apresentando uma combinação de fatores e elementos. O primeiro nível é o reconhecimento direto da sequência, que ocorre precocemente à formação do spliceossoma, em um evento que pode ser afetado por mutações do tipo *cis-acting*, as quais podem afetar sítios de *splicing* alternativo ou constitutivo. O segundo nível consiste em mudanças do

tipo *trans-acting*, que perturbam a maquinaria básica de splicing ou de sua regulação (BRINKMAN, 2004).

2.4.3 Splicing alternativo *versus* câncer

Alteração no padrão de splicing alternativo em resposta a estímulos externos parece ser um processo fisiológico elaborado por muitas células. No entanto, uma reprogramação da maquinaria de splicing, devido a diversas alterações celulares, pode levar a expressão diferencial dos fatores de splicing fazendo com que determinada variante seja expressa em maior ou menor quantidade (STAAM et al., 2005). Em contrapartida, falhas no mecanismo de splicing alternativo, bem como na sua regulação, podem estar envolvidas em um grande número de processos patológicos, incluindo o câncer. Nesse aspecto, variantes transcricionais específicas em diversos cânceres, podem estar associadas aos diferentes estágios da lesão, podendo servir como marcadores diagnósticos e prognósticos (GUIMARÃES et al., 2006; OKUMURA et al., 2005).

Existem na literatura inúmeros trabalhos relacionando splicing alternativo e câncer. Genes envolvidos na regulação da morte celular, ou apoptose, como os da família Bcl-2, representam importantes exemplos dessa associação. Alterações no mecanismo de splicing alternativo do gene Bcl-2 foram encontradas em linfomas foliculares e carcinomas gástricos devido à superexpressão da isoforma protéica Bcl-2 α , que parece também estar relacionada à resistência ao tratamento quimioterápico (TSUJIMOTO; CROCE, 1986; KUME et al., 1999; ZHANG et al.,

1999). Outro membro dessa família, o gene Bcl-x, produz duas variantes de splicing, Bcl-xS e Bcl-xL, sendo que esta última produz uma proteína com intensa função anti-apoptótica similar a da Bcl-2. É relatada uma expressão predominante de Bcl-xL em muitos linfomas, o que parece relacionar-se fortemente a patogênese dessas lesões (XERRI et al., 1998). Já para o gene Bax foram descritas cinco variantes de splicing, sendo a Bax- α a preferencial, cuja proteína codificada possui propriedades pró-apoptóticas. No entanto, baixos níveis de Bax- α foram correlacionados com pior prognóstico em carcinomas orais e oro-faríngeos (ITO et al., 1999). Outros exemplos clássicos de variantes associadas a cânceres estão representados pela família de glicoproteínas de membrana CD44 (WEG-REMERS et al., 1998). Algumas variantes de splicing da família CD44 foram encontradas hiperexpressas em carcinomas gastrointestinais, de tireóide e de mama (SNEATH; MANGHAM, 1998).

2.5 Caracterização do gene homeobox TGIF1

O gene TGIF1 (<http://ncbi.nlm.nih.gov> - TGFB-induced factor homeobox 1 [OMIM #602630]), é um repressor transcricional e membro da superclasse TALE (three-amino acid loop extension) de homeodomínios atípicos, pois possuem a inserção de 3 aminoácidos entre as hélices 1 e 2 do homeodomínio (BERTOLINO et al., 1995). O gene TGIF1 está localizado no cromossomo 18p11.3, e apresenta nove exons em sua região cromossômica de aproximadamente 47138 pares de base (pb).

Mutações no gene TGIF1 estão associadas à hiposencéfalia tipo 4, uma anormalidade estrutural do cérebro (GRIPP et al., 2000). É relatado que o gene TGIF1 realiza o processo de splicing alternativo produzindo oito variantes de mRNA que codificam quatro isoformas distintas (denominadas a [401 aa], b [286 aa], c [272

aa] e d [252 aa]) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>.Gene ID 7050 / Evidence viewer). A variante 1 codifica a isoforma “a,” a variante 2 codifica a isoforma “b”, as variantes 3 e 4 codificam a isoforma “c” e as variantes 5, 6, 7 e 8 codificam a isoforma “d”.

2.5.1 Aspectos funcionais e vias de sinalização conhecidas

A TGIF1 parece atuar em várias vias de regulação transcricional, como um repressor ligado ao DNA, ou como um correpressor em associação a outras proteínas ligantes ao DNA (WOTTON et al., 2001).

A TGIF1 foi identificada *in vitro* pela primeira vez em ratos como um fator transcricional de 272 aa (<http://ncbi.nlm.nih.gov> NP_775300) que reduzia a atividade transcricional celular através da sua ligação ao elemento responsivo específico a retinóides (DR1 RXRE), e que estava localizado na região promotora da proteína CRBP II (celular retinol binding protein II). Para isso, a TGIF1 competia, no contexto do DNA, com o RXR (rexinoid or retinoid X receptor) em relação a essa ligação (BERTOLINO et al., 1995). Essa região promotora de CRBP II em que o TGIF se ligou (DR1 RXRE), aparentemente possui um sítio de ligação pequeno para o TGIF1. No entanto, esse sítio não parece ser conservado em humanos e poucos RXRE possuem sítios adjacentes de ligação ao TGIF, sugerindo que essa via primeiramente descrita para o TGIF1 em relação à cascata dos retinóides é um mecanismo regulatório improvável.

Mais recentemente foi descrito, pela primeira vez *in vivo*, em estudos com camundongo, que o TGIF1 interage com o sítio de ligação presente no RXR α e reprime a transcrição de elementos responsivos a retinóides (DR1 RXRE). Para

efetivar essa função repressora, o TGIF1 precisa recrutar um correpresor geral chamado CtBP para agir conjuntamente na região do RXR α . Além disso, a interação de TGIF1 com RXR α é reduzida com a adição de ácido retinóico, já que ambos competem pela ligação ao RXR (BARTHOLIN et al., 2006).

O papel para o TGIF1 melhor caracterizado é o de um correpresor transcricional da cascata de sinalização ativada pelo TGF β . Sabe-se que o TGF β se liga e ativa um complexo de receptores na superfície celular (receptores tipo I e II) que por sua vez fosforilam e ativam uma série de mediadores intracelulares representados pelas proteínas Smad (Sma- and Mad-related protein). Finalmente essas proteínas, dependendo do estímulo citoplasmático, formam complexos e entram no núcleo para geralmente promover a inibição da transcrição. Uma situação comum observada ocorre quando, Smads ativadas no citoplasma, por exemplo, Smad 2 (ou 3), formam complexos com Smad 4 e são transportadas para o núcleo para se ligarem ao DNA. A ativação da transcrição, nesse caso, vai depender da interação do complexo Smad2/Smad4 com coativadores, tais como p300/CBP. Dessa maneira, a TGIF compete com esses ativadores e se liga ao complexo de Smads, reprimindo a transcrição. A TGIF1 se liga preferencialmente à sequência CTGTCAA do DNA, sendo os cinco nucleotídeos centrais mais importantes para essa ligação (BERTOLINO et al., 1995).

Para exercer sua função de inibição, no contexto do complexo Smad2/Smad4, o TGIF1 depende do recrutamento de outros correpresores tais como histona deacetilases (HDACs), as quais causam uma compactação da estrutura do nucleossoma resultando em limitação ao acesso do DNA por outros fatores de transcrição (WOTTON et al., 2001; BARTHOLIN et al., 2006).

O TGIF1 parece conter pelo menos dois domínios repressores funcionalmente separados. O domínio amino-terminal, que inclui parte do homeodomínio, e reprime a transcrição independente da atividade de histonas deacetilases (HDACs). Esse domínio interage com regiões protéicas ligadoras ao TATA-box ou outros fatores de transcrição gerais. E o domínio carboxi-terminal que parece conter duas regiões que contribuem para sua atividade repressora, a qual envolve interação obrigatória com as HDACs (WOTTON et al., 1999). Além disso, TGIF também parece interagir através de sua região carboxi-terminal com o domínio α -helix 2 do corepressor mSin3 para exercer sua ação repressora sobre o complexo de Smads ativadas pelo TGF beta (WOTTON et al., 2001).

Outro mecanismo proposto para supressão de Smad 2 seria através da sinalização de c-jun N-terminal cinases. Essa atividade supressora é mediada principalmente por c-Jun, uma serina/treonina cinase citoplasmática que favorece a associação de Smad 2 com o TGIF1, interferindo na associação de Smad 2 com o coativador p300 em resposta a sinalização do TGF beta (PESSAH et al., 2001). Por outro lado, Chen et al. (2003) relataram que o TGIF1 também pode ser regulado pelo TGF beta, indicando um mecanismo de feedback negativo.

Lo, Wotton e Massagué (2001) identificaram a via do Ras como sendo a primeira via conhecida na regulação do TGIF, sugerindo uma provável ligação entre a via das Smads e a via do Ras em nível transcricional de maneira que a sinalização do EGF via Ras controla o TGIF1, que por sua vez reprime a via das Smads. Esses autores demonstram que a ativação da cascata do Ras-Mek-Erk pelo EGF resulta em rápida fosforilação dos sítios T235 e T239 da região C-terminal da proteína do TGIF1, aumentando a sua meia vida. Esse aumento na sua estabilidade resulta em

aumento da sua atividade repressora ao favorecer a formação do complexo Smad(2)-TGIF1-HDAC1.

2.5.2 TGIF1 *versus* câncer

Existem poucos trabalhos científicos publicados relacionando o gene TGIF1 com o processo de carcinogênese. Os órgãos relacionados até o momento são: esôfago, estômago e fígado. Dados não publicados relacionam esse gene a leucemias e carcinomas epidermóides de boca.

O TGIF1 foi encontrado superexpresso em carcinomas epidermóides de esôfago. Nas linhagens que exibiam essa superexpressão foi observada resistência à inibição do crescimento mediada pelo TGF- β quando comparadas às linhagens que não apresentavam a superexpressão da proteína do TGIF1. Os autores concluíram que o gene estava ativado nas linhagens de CE de esôfago por amplificação gênica, inibindo a cascata dos genes alvos do TGF- β , que por sua vez, deixavam de prevenir a progressão do ciclo celular. (NAKAKUKI et al., 2002).

Em linhagens celulares de carcinoma gástrico transfectadas com TGIF1 não houve comportamento biológico mais agressivo em relação ao grupo controle, provavelmente devido à indução da diferenciação celular nessas linhagens. De outra forma, os autores também observaram que células transfectadas com TGIF1 adquiriram resistência à inibição do crescimento quando tratadas com TGF- β (HU et al., 2005).

Vale ressaltar que a via do TGF β é conhecida por ter um duplo papel no câncer. Em tecidos normais, sua ativação induz uma resposta antiproliferativa e pró-

apoptótica agindo como supressora na tumorigênese inicial. No câncer avançado, por outro lado, ocorre a perda de resposta aos estímulos inibitórios da via do TGF β , que pode ser utilizada como um fator de progressão tumoral, induzindo imunossupressão, angiogênese, transdiferenciação epitélio-mesenquimal e aumento do potencial metastático (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003).

A superexpressão do TGIF1 foi correlacionada a eventos iniciais que predisporiam a malignização em células hepáticas. Através de estudos em camundongos transgênicos para EGF, Borlak et al. (2005) investigaram a carcinogênese hepática e encontraram, dentre outras proteínas, a proteína do TGIF1 superexpressa em relação a amostras controles normais.

Hamid, Patherson e Brandt (2007) sugeriram um papel para o TGIF1 em leucemias, de maneira que a expressão diminuída do TGIF1 nessas lesões pode levar ao aumento de atividade da cascata de sinalização do TGF β , resultando em quiescência de células tronco hematopoiéticas e, portanto, deixando as células escaparem dos efeitos tóxicos da quimioterapia. Os autores levantaram a intrigante possibilidade de que níveis basais do TGIF1 poderiam predizer, a priori, o prognóstico de pacientes que pudessem desenvolver leucemias.

Em relação ao carcinoma epidermóide de boca, transcritos do TGIF1 foram avaliados em 20 amostras pareadas de CEBs e TNs, estando presentes em 55% de ambas as amostras. Houve concordância significativa entre os resultados da amplificação desses transcritos em CEB e TN. Transcritos do TGIF1 também foram localizados por ISH mostrando uma expressão diminuída em áreas mais indiferenciadas do carcinoma epidermóide de boca (MATIZONKAS-ANTONIO, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Comparar diferenças na frequência de expressão das oito variantes transcricionais do gene TGIF1 entre os grupos de CEB e TN, através de RT-PCR.

Objetivos Específicos

1. Verificar a relação das variantes transcricionais entre si no grupo de pacientes portadores de CEB.
2. Relacionar a expressão das variantes transcricionais de maior interesse com aspectos histológicos e dados clínicos de pacientes portadores de CEB.
3. Relacionar as variantes transcricionais de interesse, os aspectos histológicos e os dados clínicos selecionados com a sobrevida dos pacientes portadores de CEB.
4. Avaliar a expressão da proteína do TGIF1 em tecidos parafinados de pacientes portadores de CE de língua e assoalho, através de IHQ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Critérios utilizados

- Critérios de inclusão: foram incluídas amostras de CEB (comprovadas por exame anátomo-patológico da peça cirúrgica) de pacientes acima de 40 anos de idade, de ambos os sexos, com lesões intra-orais, preferencialmente de língua e/ou assoalho bucal, que representem o sítio primário da lesão.

- Critérios de exclusão: foram excluídas amostras de CEB situadas em região labial e amostras com RNA considerado regular após extração ou que não fossem amplificadas por algum dos genes constitutivos (GAPDH e/ou HPRT).

4.2 Casuística

Foram liberadas alíquotas de RNA total, provenientes de 55 tecidos congelados de pacientes portadores de CEB e 22 alíquotas de RNA total de TN correspondente a margens sadias de pacientes portadores de CEB que se encontravam armazenados no banco de tumores do Hospital Ac Camargo. Sete amostras de CEB e 10 amostras de TN foram excluídas por apresentarem RNA considerado regular e/ou não serem amplificadas pelo gene constitutivo HPRT (ver adiante). Dessa maneira utilizamos 48 amostras de CEB e 12 de TN. Duas amostras de CEB

estavam pareadas com TN do mesmo paciente. Todas as amostras armazenadas no banco de tumores do Hospital possuem termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes.

As amostras de interesse foram previamente selecionadas através do sistema PINGA de buscas no banco de tumores e/ou através dos arquivos de projetos anteriores realizados pelo laboratório de Patologia Molecular do Instituto Ludwig.

O projeto foi autorizado pelo comitê de ética da FOUSP (protocolo 76/06) e do Hospital Ac Camargo (protocolo 819/06) (vide anexos A e B, respectivamente).

4.3 Dados dos pacientes

Os dados clínicos e histológicos referentes a cada paciente foram obtidos dos prontuários e microfilmes arquivados no SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatística) do Hospital Ac Camargo ou nos arquivos da anatomia patológica do Hospital. Os dados clínicos obtidos incluíram idade (grupo de 40-60 anos e grupo acima de 60 anos), sexo, raça, tempo de evolução da lesão, história familiar oncológica e história de consumo de álcool e tabaco. Os dados da peça cirúrgica incluíram localização e tamanho da lesão (pT), comprometimento linfonodal (pN), estadiamento patológico (pTNM), diferenciação histológica (dif. histol.) e invasões perineural (IPN), vascular sanguínea (IVS) e vascular linfática (IVL). Segue em anexo a ficha utilizada para preenchimento dessas informações (anexo C) e a tabela contendo todas as informações clínicas e histológicas desses pacientes (anexo D).

4.4 Obtenção de RNA total

As amostras de tecidos congelados de CEB foram previamente emblocadas em Tissue Teck e analisadas em HE por um patologista experiente do Hospital Ac Camargo para confirmação histológica. As amostras com contaminantes teciduais tais como glândula salivar, tecido muscular, tecido adiposo e estroma foram submetidas à microdissecção manual, a fim de selecionar o tecido tumoral de interesse, representado em média por 70-80% do espécime remanescente. Posteriormente, o tecido foi submetido à extração de RNA total utilizando solução de Trizol. O mesmo procedimento foi feito para TN, selecionando o epitélio de superfície morfológicamente livre de tumor.

A pureza do RNA extraído foi verificada através de leitura em espectrofotômetro cuja razão OD 260 e 280 foi de 1.7 a 2.0. A qualidade do RNA foi avaliada através de gel de integridade e foi considerada ótima quando as bandas 28S e 18S de rRNA estavam nítidas e intensas, numa razão de 2:1. Foram utilizadas as amostras de RNA com qualidade considerada boa ou ótima (ver anexos E e F).

4.5 Confecção de cDNA ou Transcrição Reversa (RT - Reverse Transcriptase)

As alíquotas de RNA total de cada amostra foram liberadas em concentrações variando de 0,5 a 1 µg. O protocolo de conversão do RNA em cDNA foi feito

segundo instruções do fabricante, utilizando-se a enzima Superscript III (Invitrogen) da maneira descrita a seguir.

Ao volume de RNA contendo 0,5 a 1 μ g foram adicionados 2 μ l de OligoDT (Invitrogen) e quantidade de água DEPC alcalina necessária para completar um volume total de 20 μ l. Os tubos foram então aquecidos a 70°C por 10 minutos, resfriados em gelo picado por 5 minutos e tratados com 4 μ l de solução tampão apropriada (5x buffer), 2 μ l de DTT (Ditiotreitol) e 1 μ l de dNTP a 10 mM (deoxinucleotídeos trifosfato). Os tubos foram agitados por 15 segundos e mantidos a 25°C durante 10 minutos e então aquecidos por 2 minutos a 42°C. Aos tubos foi adicionado 1 μ l da enzima Superscript III e em seguida mantidos a 4°C durante 50 minutos. A reação foi finalizada a 70°C por 15 minutos a fim de neutralizar a enzima.

Os cDNAs, assim obtidos foram diluídos para se obter uma concentração final de 5 ng/ μ l. Posteriormente, foram armazenados em freezer a -20°C para uso posterior.

Todas as reações de transcrição reversa bem como as etapas laboratoriais posteriores referentes às reações de amplificação foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular da FOU SP.

4.6 Desenho dos iniciadores

O modelo genético do TGIF1 utilizado em nosso estudo foi o de 14 de Novembro de 2007, para *Homo sapiens*, proveniente do NCBI -National Cancer for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Dessa maneira, o gene analisado

possui nove exons e produz, por splicing alternativo, oito variantes transcricionais conforme a figura 4.1.

Os iniciadores utilizados foram confeccionados para regiões interexon utilizando-se o programa Gene Tool 2.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá, <http://biotools.com>) tomando-se por base a sequência dos transcritos obtida do banco de dados do NCBI.

Inicialmente foi confeccionado um par de iniciadores genéricos para o TGIF1 e em seguida pares de iniciadores específicos para cada uma de suas variantes transcricionais.

A var6 foi excluída desse estudo devido à impossibilidade de se confeccionar iniciadores específicos, já que seu único exon diferencial (exon 6) está contido totalmente no único exon diferencial da var1 (também exon 6) (figura 4.1). Em contrapartida, o exon diferencial da var1 é grande, o que possibilitou a confecção de iniciadores específicos para esta variante. Vale ressaltar que a var1 e a var6 codificam isoformas protéicas diferentes, A e D, respectivamente, portanto não são interessantes de serem analisadas em conjunto. Além disso, houve dificuldade de se confeccionar iniciadores específicos para a var3 a qual foi analisada juntamente com a var4 (dado obtido a partir do sequenciamento do produto gerado pelos iniciadores da original var3). Por outro lado, conseguiu-se analisar a var4 separadamente. Vale também ressaltar que tanto a var3 quanto a var 4 codificam a mesma isoforma protéica C., portanto sua análise em conjunto torna-se interessante. Em função do exposto, foram analisadas as var1, var2, var3,4, var4, var5, var7 e var8.

Esses iniciadores tiveram produto variando de 350 a 550 pb (pares de base). A figura 4.2 exemplifica a confecção dos iniciadores da variante 2, realizada através do software Gene Tool. A tabela 4.1 mostra a sequência de todos os iniciadores

confeccionados e o tamanho dos produtos por eles amplificados. Foram também utilizados iniciadores para o gene constitutivo de alta expressão GAPDH e para o gene constitutivo de baixa expressão HPRT, ambos utilizados como controles endógenos das amostras.

Os produtos amplificados pelos iniciadores expostos foram confirmados por sequenciamento no centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Ciências biomédicas da USP.

Figura 4.2- seqüência dos iniciadores da variante 2. A seqüência anti senso (forward), mostrada no sentido 5'3'possui 23 nucleotídeos (nt) (100 ao 122). A seqüência senso (reverse), sentido 3'5'possui 19 nt (511-493). O tamanho do produto amplificado pelo par de iniciadores é de 412 pares de base (pb). Ao lado de cada iniciador é mostrada a TM (temperatura de melting), na qual ocorre associação dos iniciadores a fita molde de cDNA

Tabela 4.1- Sequência dos iniciadores em relação ao gene, ao número de acesso no Gene Bank, ao sentido e ao tamanho do produto

GENE	NÚMERO DE ACESSO	INICIADORES (5'3')		TAMANHO DO PRODUTO (pb)
		SENDO	ANTI-SENDO	
TGIF1 genérico	NM_170695	ggctcctcccctgccatgctg	tgcaacatccactagaagctg	497
Variante 1	NM_170695	atccccagtgctcctttcca	agccagcggatgaagaaaggt	375
Variante 2	NM_173207	gtgcctcgccagctttaacaacc	acggcgggaaattgtgaac	412
Variante 3	NM_173208	ctggaaggagcgggcg	acggcgggaaattgtgaa	514
Variante 4	NM_003244	caggagcaggaacaaagga	agccaatcccgaagaatctg	452
Variante 5	NM_173209	cccgagggacgagtacagc	atgccatcacggactccac	426
Variante 7	NM_173211	accctccccaccgccacatt	tgccatcacggactccaca	398
Variante 8	NM_174886	gccgcagggagccagagact	gccaatcccgaagaatctgc	357
GAPDH	NM_002046.3	gggctctccagaacatcatc	gtgtccaggggtcttactc	421
HPRT	NM_000194.1	tgaggatttgaaaggggtgt	gagcacacagagggtacaa	117

Figura 4.1- Regiões N e C-terminais das variantes do gene TGIF1 (Gene ID:7050). A região C-terminal é comum a todas variantes. A diferenciação entre elas ocorre através da sua região N-terminal

4.7 PCR (Polimerase Chain Reaction)

Todos os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR (Life Technologies, Gaithersburg, MD). As amplificações foram previamente realizadas para o gene constitutivo de alta expressão GAPDH e para o gene constitutivo de baixa expressão HPRT, ambos utilizados como controle endógeno das amostras. Dessa maneira, 7 amostras de CEB e 10 amostras de TN foram excluídas por terem sido negativas para o HPRT e/ou por terem sido previamente consideradas como regulares.

Inicialmente, foram feitas reações de PCR utilizando-se um par de iniciadores genéricos (comum a todas as variantes do gene TGIF1). Em seguida, somente nos casos positivos, foram feitas amplificações com os pares de iniciadores específicos para cada variante.

As figuras 4.3 e 4.4 ilustram os iniciadores das variantes transcricionais 1 e 2 com suas respectivas regiões amplificadas. O mesmo foi feito com as outras variantes (anexo G).

Figura 4.3- Esquema da variante transcricional 1 do gene TGIF1, mostrando a sequência dos iniciadores e a região interexon a ser amplificada

Figura 4.4- Esquema da variante transcripcional 2 do gene TGIF1, mostrando a seqüência dos iniciadores e a região interexon a ser amplificada

Foram utilizadas, como controles positivos das reações, margens morfológicamente sadias de órgãos humanos tais como ovário, esôfago, estômago, mama e próstata, provenientes de pacientes portadores de neoplasias malignas epiteliais nesses órgãos. Esse material foi obtido do banco de tumores do Hospital do Câncer Ac Camargo. A escolha desses órgãos foi feita após submissão da seqüência dos iniciadores do TGIF1 e de suas variantes ao programa de PCR eletrônico para Splicing Alternativo disponibilizado publicamente pelo Laboratório de Bioinformática da “Ewha Womans University” na Korea (<http://genome.ewha.ac.kr/ASePCR>). O resultado do PCR eletrônico confirmou o tamanho do produto gerado pelos iniciadores, bem como identificou sua localização dentro dos transcritos e apontou diversos órgãos humanos em que esses transcritos foram encontrados, através de um sistema de busca nos bancos de dados de biotecnologia existentes.

A otimização das reações foi baseada no “Troubleshooting for PCR” (<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html>), utilizando-se todos os pares de iniciadores em estudo e os órgãos humanos selecionados. Após a determinação do controle positivo adequado para cada par de iniciador, foram realizadas as reações nas amostras de CEB e TN.

Para cada reação foi utilizada em média 10 ng de RNA convertido em cDNA para uma mistura de 25 µl. As reações de PCR foram todas realizadas em 40 ciclos e em temperaturas de associação variando de 55 a 62 graus. Aos tubos Eppendorf foram acrescentados os seguintes reagentes: cDNA, iniciadores senso e antisenso, dNTP, tampão (10X), magnésio, enzima Taq polimerase (Invitrogen do Brasil) e água destilada/autoclavada para completar 25 µl de solução. A tabela 4.2 mostra os volumes e as respectivas concentrações dos reagentes utilizados nessas reações.

Tabela 4.2- Reagentes utilizados para as reações de PCR com suas respectivas concentrações num tubo contendo 25 µ de solução

Componentes	Volume	Concentração (solução de 25 µl)
10x Buffer	2,5 µl	1x
Magnésio (MgCl ₂)	0,75µl	1,5mM
DNTP (10mM cada nt)	0,6 µl	240 µM
Iniciador senso	0,5 µl	5 pmol
Iniciador anti-senso	0,5 µl	5 pmol
Enzima Taq DNA polymerase	0,4 µl	2 U
cDNA	2,0 µl	10ng

Esses tubos foram levados ao termociclador PTC-100 Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc), no qual foram submetidos a um pré-tratamento de denaturação à 94°C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos de reação. Nesses ciclos ocorreu uma denaturação de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, associação dos iniciadores por 50 segundos (TGIF1 genérico: 55°C, var1: 60°C, var2: 57°C, Var3,4: 60°C, var5, var7 e var8: 62°C) e extensão enzimática à 72°C por 50 segundos. Após o ciclo final houve uma extensão adicional de 7 minutos a 72°C. Para os genes constitutivos, as reações ocorreram a 55°C para o GAPDH e 58°C para o HPRT, ambos com 35 ciclos. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Os resultados obtidos das reações foram avaliados em gel de agarose 2% (Invitrogen) contendo brometo de etídeo e visualizados em um transiluminador com

luz UV. A seguir as imagens foram adquiridas através de um sistema de captura digital (AlphaDigitoc).

4.7.1 Análise dos resultados e análise estatística das variantes do TGIF1

Foi avaliada a frequência de amplificação das variantes transcricionais do gene TGIF1 em 48 amostras de CEB e 12 amostras de TN, através de sua presença ou ausência. Não foi levada em consideração a intensidade dessa amplificação. Foram feitos cruzamentos que comparavam a proporção de detectados e não detectados entre os grupos de CEB e TN, por meio de análises univariadas de associação, utilizando-se o teste do Qui-quadrado de Pearson (PEREIRA, 1999). Esse teste baseia-se nas diferenças entre valores observados e esperados, avaliando se as proporções em cada grupo podem ser consideradas semelhantes ou não. O teste exato de Fisher foi utilizado nas situações onde os valores esperados foram inferiores a cinco. Consideramos um nível de significância de 0,05, ou seja, todo nível descritivo abaixo deste valor é considerado estatisticamente significativo, portanto com baixas chances de ocorrer ao acaso. Em seguida, foram feitos novos cruzamentos para avaliar uma possível associação entre as variantes dentro do grupo de pacientes portadores de CEB. Dessa maneira, foram selecionadas três variantes cujos resultados foram mais expressivos. Essas variantes, por sua vez, foram correlacionadas com dados clínicos e histológicos dos pacientes tais como idade, localização anatômica, pT, pN, pTNM, diferenciação histológica, IPN, IVS e IVL.

Quando a associação foi estatisticamente significativa, o resíduo padronizado, o qual é a diferença entre o valor observado e esperado expresso em unidades de desvio padrão, foi observado para verificarmos quais categorias estão contribuindo para essa associação, pois estes resíduos padronizados representam valores de relação biunívoca com probabilidades de ocorrência. Neste caso, valores maiores que 1,96 ou menores que -1,96 têm pequenas chances de ocorrência ($\pm 2,5\%$), e podem assim instruir pontos de corte para um nível de significância de excesso ou falta de ocorrências, respectivamente (PEREIRA, 1999).

Posteriormente, foram feitas análises univariadas de sobrevida do paciente utilizando-se o tempo de duração entre a data do diagnóstico e a data do óbito ou a data do último seguimento (duração do acompanhamento ou duração do follow-up), considerando-se o desfecho óbito relacionado ao câncer. Optamos por trabalhar com o método de Kaplan-Meier (ARMITAGE; BERRY, 1994), pois ele permite que sejam construídas curvas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de observação, durante todo o período de acompanhamento do indivíduo e não somente com os resultados finais. Foram considerados os óbitos relacionadas à idade, localização anatômica, pN, pT, pTNM, diferenciação histológica, IPN, IVS e IVL.

Para comparação das curvas de Kaplan-Meier, utilizamos o teste de *log-rank* (ARMITAGE; BERRY, 1994), com valor de significância de $p \leq 0,10$. A estatística desse teste é a diferença entre o número observado em cada grupo e uma quantidade que, para muitos propósitos, pode ser pensada como o correspondente número esperado de falhas sob a hipótese nula (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Neste tipo de análise, para cada variável é realizado um teste de significância que indica se a variável em questão influencia ou não a resposta de interesse (óbito).

Para análise multivariada, utilizamos como critério de seleção inicial das variáveis, significância segundo Kaplan-Meier. Para essa análise, optamos pelo Modelo de Riscos Proporcionais de Cox (COX, 1972) com intervalo de confiança de 95%, pois permite avaliar ao mesmo tempo todos os efeitos.

Uma das vantagens deste modelo é que o efeito (ou importância) de cada variável é medido considerando todas as variáveis, ou seja, o efeito calculado para uma variável é corrigido pela influência das outras. Além disto, é possível estimar o risco relativo entre pacientes com diferentes quadros clínicos.

O modelo supõe que os riscos de óbito ou doença para todas as categorias sejam proporcionais, ou seja, o risco dentre pacientes de grupos distintos é sempre o mesmo durante todo acompanhamento (as curvas não se cruzam). Em outras palavras, a razão entre os riscos permanece constante. Para esta suposição construímos gráficos do tipo *log-minus-log*, que não indicaram violação da proporcionalidade para nenhuma das variáveis que permaneceram no modelo.

Para construção do modelo, o método utilizado foi o *Stepwise Forward* que inclui progressivamente variáveis no modelo segundo ordem decrescente de associação com a variável resposta. Para entrar no modelo exige-se um nível descritivo (valor de p) de pelo menos $p=0,05$. Para deixar o modelo, após ajuste por entrada de outras variáveis, tolera-se um nível descritivo de até $p=0,10$.

A execução dos cálculos estatísticos foi realizada utilizando-se o software SPSS for Windows, versão 12.0. As análises estatísticas foram realizadas por Daniela Ribeiro Parreira (Mestre em Estatística [UFSCar], Dissertação com ênfase em análise de Sobrevivência), membro do Laboratório de Epidemiologia e Estatística (LEE) localizado no Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese em São Paulo.

4.8 Análise da expressão da proteína do TGIF1

Foram utilizados 46 casos de material parafinado do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP, referentes à biópsias incisionais de pacientes portadores de CEB, todas localizadas em região de língua e/ou assoalho bucal. As lâminas referentes a esses casos foram revistas por um patologista experiente e os casos foram graduados em bem diferenciados (n=13), moderadamente (n=12) e pobremente diferenciados (n=21), seguindo os critérios da OMS (Organização Mundial de Saúde) (BARNES et al, 2005). Essa análise foi realizada em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina, os quais foram observados através de microscopia de luz. Todos os casos foram submetidos a reações imunoistoquímicas para avaliação da expressão da proteína do TGIF1 utilizando um anticorpo comercialmente disponível que reconhece todas as suas quatro isoformas protéicas descritas.

4.8.1 Técnica Imunoistoquímica (IHQ)

As reações foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP com a ajuda da pesquisadora Flávia Caló de Aquino. As reações imunoistoquímicas ocorreram da maneira descrita a seguir:

Para marcação da proteína TGIF1, as reações imunoistoquímicas foram realizadas em todas as lesões obtidas de material parafinado, a partir do método do

polímero marcado (EnVision, DAKO). Inicialmente, cortes histológicos na espessura de 3µm foram estendidos em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silano a 10% em etanol absoluto) e, posteriormente, armazenados em estufa a 60°C por no mínimo 24 horas para sua melhor fixação.

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 15 minutos cada, sendo o primeiro a 60°C em estufa e o segundo em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram re-hidratados em banhos descendentes de etanóis, com passagens em etanol absoluto por três vezes, etanol 95% e etanol 85% durante 3 minutos cada, e imersos em solução de etanol 95% + hidróxido de amônia 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos.

Após lavagem em água corrente, seguida por dois banhos em água destilada de 5 minutos cada, procedeu-se à etapa de recuperação antigênica, que consistiu em mergulhar as lâminas em solução de EDTA pH 8,0 em banho-maria a 95°C durante 30 minutos.

Após o tratamento os cortes foram novamente lavados em água corrente, seguidos por duas passagens em água destilada por 5 minutos. Para inativação da peroxidase endógena tecidual, foi realizada imersão dos cortes histológicos em dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes + metanol (1:1).

Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente e posteriormente realizou-se tamponamento com imersões sucessivas de TRIS, pH 7,4, por 5 minutos cada. Em seguida os cortes foram incubados em câmara úmida com o anticorpo primário do TGIF1 (H-172; SC9084 – Sta Cruz/USA) diluído em solução de TRIS, pH 7,4 acrescido de albumina bovina a 1%, contendo azida sódica a 0,1% (BSA – Bitest S/A – São Paulo, Brasil), sob diluição de 1:300, durante 18 horas a 4°C.

Após a incubação, foi realizado tamponamento com três banhos de TRIS por 5 minutos cada. As etapas seguintes foram realizadas automaticamente, com o auxílio do sistema de coloração universal Autostainer DAKO (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark). Após serem acomodadas no equipamento, as lâminas contendo os cortes foram submetidas a duas novas lavagens com TRIS de 5 minutos cada e então encubação com EnVision™ + Dual Link System Peroxidase (K4061; DAKO, Glostrup, Denmark) durante 30 minutos.

As lâminas foram novamente lavadas por duas vezes em TRIS (5 min cada) para serem encubadas em cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina, K3468; DAKO, Glostrup, Denmark) para revelação da reação durante dez minutos. Os cortes foram então lavados em TRIS, pH 7,6, por 3-4 minutos, seguidos de lavagem em água corrente por 5 minutos e duas lavagens em água destilada. O tecido foi contracorado com Hematoxilina de Mayer por 10 min e lavado em duas passagens de água destilada.

Após esta passagem, as lâminas foram retiradas do equipamento e processadas manualmente. Os cortes foram desidratados em cadeia de álcool ascendente por 5 min cada, nas concentrações(%) de 50, 60, 70, 80, 90, 95, absoluto(1), absoluto (2), absoluto (3), e diafinizados em dois banhos de xilol. As lâminas foram então montadas em resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) para exame ao microscópio de luz.

Como controle positivo das reações foi utilizado um caso de carcinoma epidermóide de boca utilizado durante as otimizações. O controle negativo foi obtido através da supressão do anticorpo primário durante a realização da reação.

4.8.2 Análise dos resultados e análise estatística das reações de IHQ

Os cortes corados pela técnica de imunoistoquímica foram examinados ao microscópio de luz em conjunto com um patologista experiente, sendo considerada positiva as células que apresentavam marcação nuclear e/ou citoplasmática evidenciada pela marcação de coloração acastanhada, sem levar em conta a diferença de intensidade da cor. Foi realizada a análise da imunomarcação semiquantitativamente de acordo com os escores: -grau 0, ausência de marcação; -grau I, marcação em até 50% das células; -grau II, marcação em 50-75% das células e -grau III, marcação acima de 75% das células (OGBUREKE et al., 2007).

Foram feitos cruzamentos entre e dentre os grupos: pobremente diferenciados (PD), moderadamente diferenciados (MD) e bem diferenciados (BD) em relação à graduação imunoistoquímica, e a marcação nuclear e/ou citoplasmática. Foram feitas análises univariadas de associação, utilizando-se o teste exato de Fisher, com valor de significância de $p \leq 0,05$.

A execução dos cálculos estatísticos foi realizada utilizando-se o software SPSS for Windows, versão 12.0. As análises estatísticas foram realizadas por Daniela Ribeiro Parreira (Mestre em Estatística [UFSCar], Dissertação com ênfase em análise de Sobrevivência), membro do Laboratório de Epidemiologia e Estatística (LEE) localizado no Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese em São Paulo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

A relação das amostras congeladas dos 48 pacientes portadores de CEB, seus dados clínicos e histopatológicos, estão apresentados no anexo D. As amostras referentes a esses pacientes estavam representadas predominantemente por homens (83,3%), brancos (91,3%, n=23), apresentando média de idade de 59,3 anos, estando a maioria situados nas 6 e 7^a décadas de vida (gráfico 5.1). A maioria dos pacientes era fumante e/ou etilista (91,5%, n=47), e apresentava lesão com tempo de evolução em média de 5,3 meses (n=28). As lesões estavam localizadas preferencialmente em assoalho bucal e/ou língua (68,7%), seguidas por outros sítios intrabuciais tais como trígono retromolar, gengiva, palato e mucosa jugal (gráfico 5.2). Quase metade desses pacientes foi a óbito (47,9%) e desses 78,3% foram devidos ao CE, com tempo médio de vida de 12,2 meses após o diagnóstico.

Gráfico 5.1- Distribuição do câncer bucal segundo o sexo e a década de vida

Em relação aos dados da peça cirúrgica, observou-se que o envolvimento de linfonodos (pN) estava presente em 53,2% (n=47) dos pacientes (gráfico 5.2). Para

análise do tamanho da lesão (pT) e estadiamento patológico (pTNM) os dados foram agrupados da seguinte maneira: pT: T1/T2 (tamanho até 4,0 cm) ou T3/T4 (tamanho maior que 4,0 cm) e pTNM: estadiamento precoce I/II (pT1 ou pT2, pN0) ou estadiamento avançado III/IV (pT3 ou pT4, pN0 ou qualquer pT, pN+), de acordo com os critérios da UICC (1992).

Gráfico 5.2- Distribuição do câncer bucal segundo a localização e o envolvimento de linfonodos

Dessa maneira 70,2% (n=47) das lesões estavam no grupo T1/T2 e 63,9% (n=47) apresentavam estadiamento avançado (III/IV) (gráfico 5.3).

Gráfico 5.3- Distribuição do câncer bucal segundo o tamanho e estadiamento patológico

A graduação histológica dos tumores mostrou que 55,3% (n=47) eram bem diferenciados (BD), 40,4% (n=47) moderadamente diferenciados (MD) e apenas 4,3% (n=47) eram pobremente diferenciados (PD). Além disso, 47,8% (n=46) dos

casos apresentavam invasão perineural, 22,2% (n=45) invasão vascular linfática e 9,1% (n=44) invasão vascular sanguínea (gráficos 5.4 e 5.5).

Gráfico 5.4- Distribuição do câncer bucal segundo diferenciação histológica e invasão perineural

Gráfico 5.5- Distribuição do câncer bucal segundo invasões vasculares sanguíneas e linfáticas

Adicionalmente foi verificado grau de instrução dos pacientes, de maneira que, 37,5% possuíam ou estavam cursando o primeiro grau, 30% possuíam ou estavam cursando o segundo grau, 27,5% possuíam ou estavam cursando ensino superior e somente 5% eram analfabetos (n=40).

5.2 Expressão das variantes transcricionais do TGIF1

A expressão das variantes do TGIF1 foi avaliada através de RT-PCR. A sequência de todos os amplicons foi confirmada após sequenciamento (figura 5.1).

Figura 5.1- Exemplo de cromatograma contendo parte do transcrito da var4 do TGIF1 enviado para sequenciamento. O mesmo procedimento foi realizado para as outras variantes

As reações foram otimizadas utilizando-se amostras de margens cirúrgicas morfológicamente sadias de esôfago, estômago, mama, ovário e próstata de pacientes portadores de neoplasias malignas nesses órgãos. A próstata e o estômago amplificaram todas as variantes. A mama não amplificou as variantes 4, 5 e 8. O ovário não amplificou as variantes 4 e 8 e o esôfago não amplificou a var7. Dessa maneira, optamos por utilizar, sobretudo, a próstata e o estômago como controles positivos das reações de RT-PCR.

Foram analisadas 48 amostras de CEB e 12 de TN. Todas as amostras mostraram amplificação para ambos os genes constitutivos (GAPDH e HPRT) (figuras 5.2 e 5.3). Os resultados obtidos através dos iniciadores genéricos para o TGIF1, mostraram amplificação dos transcritos em 100% das amostras, tanto de CEB quando de TN. A partir desse resultado, foram realizadas reações de PCR com os iniciadores específicos de cada variante em todas as amostras de CEB e TN. Os resultados dessas amplificações estão apresentados no anexo E. A figura 5.4 exemplifica a amplificação da var3,4 em algumas amostras de CEB.

Figura 5.2- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação do GAPDH nos casos 1 a 7 de CEB. C-= controle negativo; C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de bases

Figura 5.3- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação do HPRT nos casos 1 a 7 de CEB. C-= controle negativo; C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de bases

Figura 5.4- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação da var3,4 nos casos 26 a 31. C-= controle negativo; C+= controle positivo; PP= padrão de pares de base; pb= pares de bases

5.2.1 Análise estatística da expressão das variantes do TGIF1

Não houve diferença na frequência de expressão das variantes transcricionais do gene TGIF1 entre os grupos de CEB e de TN, considerando-se o nível de

significância de 0,05, conforme apresentado na tabela 5.1. Porém as variantes 4 e 8, foram as que apresentaram p-valores mais baixos.

Tabela 5.1- Proporção de detectados e não detectados de todas as variantes nos grupos de CEB e TN. Em negrito os resultados que deram p-valores mais baixos

Amplificação	CEB (N=48)		TN (N=12)		Teste exato de Fisher
TGIF1 Geral	100%		100%		
	Não	Sim	Não	Sim	p- valor ≤ 0,05
Var1	29,2%	70,8%	25%	75%	0,774
Var2	8,3%	91,7%	8,3%	91,7%	0,99
Var3,4	6,3%	93,7%	0%	100%	0,374
Var4	18,7%	81,3%	0%	100%	0,104
Var5	4,2%	95,8%	0%	100%	0,407
Var7	22,9%	77,1%	33,3%	66,7%	0,456
Var8	50%	50%	75%	25%	0,119

A tabela 5.2 e a figura 5.5 exemplificam o resultado do cruzamento da var4 entre os grupos CEB e TN.

Tabela 5.2- Proporção de detectados e não detectados da var4 nos grupos de CEB e TN

			Grupo		Total
			Tumor	Normal	
Var 4	Não Detectados	N	9	0	9
		% dentro Grupo	18,80%	0,00%	15,00%
		Residuo	1,6	-1,6	
	Detectados	N	39	12	51
		% dentro Grupo	81,30%	100,00%	85,00%
		Residuo	-1,6	1,6	
Total		N	48	12	60
Teste Exato de Fisher p- valor=0.104		% dentro Grupo	100,00%	100,00%	100,00%

Foram também realizados cruzamentos das vars entre si dentro do grupo CEB. Dos vinte e um cruzamentos realizados houve associação significativa entre sete deles, de forma que as vars 1 e 4 foram as que mais tiveram associação entre si e também com as outras variantes. Somente a var7 não mostrou relação com nenhuma das variantes analisadas (tabela 5.3).

É interessante notar que, dentro do grupo de CEB, a var1 mostrou forte relação tanto com a var4 quanto com a var8, as mesmas que apresentaram p-valores mais

baixos durante a análise em relação aos grupos CEB e TN. A tabela 5.4 e a figura 5.6 exemplificam o resultado do cruzamento da var1 com a var4.

Figura 5.5- Proporção de detectados (sim) e não detectados (não) da var4 nos grupos de CEB e TN

Tabela 5.3- Relação entre as variantes que tiveram associação significativa dentro do grupo de CEB

Cruzamentos	Teste exato de Fisher p- valor $\leq 0,05$
var1 versus var3,4	0,05
var1 versus var4	0,001
var1 versus var8	0,02
var2 versus var4	0,017
var3,4 versus var4	0,005
var4 versus var5	0,032
var4 versus var8	0,023

Tabela 5.4- Associação entre as vars 1 e 4, dentro do grupo de CEB

			Var 1		Total
			Não Detectados	Detectados	
Var 4	Não Detectados	N	8	1	9
		% dentro Var 1	57,10%	2,90%	18,80%
		Resíduo	4,4	-4,4	
	Detectados	N	6	33	39
		% dentro Var 1	42,90%	97,10%	81,30%
		Resíduo	-4,4	4,4	
Total		N	14	34	48
Teste Exato de Fisher p-valor<0,001		% dentro Var 1	100.00%	100.00%	100.00%

Figura 5.6- Associação entre as variantes 1 e 4, dentro do grupo de CEB. Não: não detectados pela var1; Sim: detectados pela var1. Em azul: não detectados pela var4 dentro da var1. Em verde: detectados pela var4 dentro da var1

Dessa forma, optamos por prosseguir o estudo utilizando somente as vars 1, 4 e 8. O teste do Qui-quadrado mostrou que não houve correlação significativa entre a expressão das vars selecionadas e as variáveis clínicas e histológicas propostas. (tabela 5.5). Porém, os resultados em relação a var1 *versus* pT (tamanho até 4 cm foi o que mais expressou a var1), var8 *versus* idade (principalmente pacientes de 40-60 expressaram mais a var8) e var8 *versus* diferenciação histológica (os casos MD-PD foram os que mais expressaram a var8) foram os que apresentaram p-valores menores.

Tabela 5.5- Variantes selecionadas e o resultado do teste do Qui-Quadrado em relação aos dados clínicos e histológicos dos pacientes com CEB. Em negrito os resultados que deram p-valores mais baixos

Variáveis	var1 (p-valor)	var4 (p-valor)	var8 (p-valor)
Sexo	0,676	0,633	0,701
Idade	0,915	0,99	0,079
Local	0,266	0,343	0,755
pT	0,129	0,99	0,464
pN	0,55	0,99	0,891
pTNM	0,84	0,99	0,846
Dif. histol.	0,596	0,711	0,181
IPN	0,425	0,464	0,55
IVS	0,302	0,566	0,99
IVL	0,698	0,99	0,99

Em relação à sobrevida dos pacientes, encontramos diferença estatística entre as curvas de sobrevivência de sete das treze variáveis analisadas, de maneira que a expressão das variantes 1 e 8, a diferenciação histológica BD, o tamanho da lesão até 4 cm (pT: T1/T2), o estadiamento patológico precoce (pTNM: I/II), as invasões vasculares sanguínea e linfática negativas mostraram tempos médios de sobrevidas maiores em relação aos grupos que não expressaram as vars 1 e 8, que tiveram diferenciação histológica MD-PD, lesões com tamanhos maiores que 4 cm, estadiamentos patológicos avançados e que apresentaram invasões vasculares sanguíneas e linfáticas, respectivamente. Estas variáveis foram, portanto, consideradas durante a análise multivariada. As variáveis idade, sexo, local, pN, IPN e a var4 foram excluídas dessa análise por não terem significância estatística nos testes de *log-rank* aplicados às curvas de Kaplan-Meier.

Os resultados detalhados de todas as variáveis analisadas em relação à sobrevivência média, intervalo de confiança e desvio padrão, estão apresentados na tabela 5.6. As variantes 1 e 8 tiveram correlação estatística com a sobrevida dos pacientes, de maneira que o grupo de indivíduos que tem sobrevida maior é o grupo que expressou a var1 (média=62 meses), da mesma forma que foi observada maior sobrevida para o grupo que expressou a var8 (média=68 meses), portanto, ambos os grupos apresentando menores riscos de óbito. Através do teste de *log-rank*, encontramos evidências de que existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo que expressou e o que não expressou a var1 (p-valor= 0,0769 < 0,10), assim como entre o grupo que expressou e o que não expressou a var8 (p-valor=0,0958 < 0,10). As curvas de Kaplan-Meier para essas variantes em relação à sobrevida dos pacientes e o risco de óbito estão apresentadas nos gráficos 5.6 e 5.7.

Tabela 5.6- Sobrevida média categorizada para cada variável. Em negrito, estão as variáveis que deram significância pelo teste de *log-rank* ($p \leq 0,10$). IC- intervalo de confiança. E.P- erro padrão

Variáveis		Sobrevida Média	IC (95%)	E. P.	<i>Log-rank</i>
Idade	< 60	59	(44 ; 74)	8	0,4066
	> 60	31	(22 ; 40)	5	
Sexo	Masculino	55	(41 ; 68)	7	0,8628
	Feminino	34	(22 ; 46)	6	
Local	Assoalho	58	(44 ; 72)	7	0,2984
	Outros	48	(27 ; 69)	11	
pN	Não	67	(52 ; 82)	8	0,11
	Sim	45	(29 ; 61)	8	
Dif. histol.	BD	63	(48 ; 79)	8	0,08
	MD - PD	44	(27 ; 62)	9	
pT	T1/T2	66	(53 ; 80)	7	0,0036
	T3/T4	32	(14 ; 50)	9	
pTNM	I / II	71	(55 ; 87)	8	0,08
	III / IV	47	(32 ; 62)	7	
IPN	Não	64	(48 ; 80)	8	0,13
	Sim	43	(27 ; 60)	8	
IVS	Não	59	(46 ; 71)	6	0,0001
	Sim	9	(4 ; 14)	3	
IVL	Não	58	(45 ; 72)	7	0,0893
	Sim	39	(15 ; 64)	12	
var1	Não	38	(17 ; 60)	11	0,0769
	Sim	62	(48 ; 75)	7	
var4	Não	39	(15 ; 63)	12	0,28
	Sim	60	(47 ; 73)	7	
var8	Não	44	(28 ; 60)	8	0,0958
	Sim	68	(54 ; 83)	8	

O modelo de Cox, para a análise multivariada, mostrou que somente o tamanho da lesão e a invasão vascular sanguínea tiveram significado estatístico. As outras variáveis foram removidas do modelo por apresentarem p-valores muito altos (tabelas 5.7/ 5.8 e gráfico 5.8). Para interpretação desse resultado, considera-se que a coluna referente a exponencial do coeficiente (exponencial de beta – EXP(B)) corresponde a estimativas do risco relativo. Para variáveis categorizadas, este número indica quantas vezes mais chance de óbito ou doença uma categoria tem em relação à outra considerando que todas as outras variáveis permanecem constantes.

Foram construídos gráficos do tipo *Log-minus-log* que não indicaram violação da proporcionalidade para nenhuma das variáveis que permaneceram no modelo. O gráfico 5.9 exemplifica o teste de proporcionalidade aplicado para a variável pT .

Gráfico 5.6- Curvas de Kaplan-Meier, mostrando maior sobrevida para o grupo que expressou a var1 (média 62 meses) e conseqüentemente menor risco de óbito para esse grupo em relação ao grupo que não expressou essa variante (média 38 meses). O teste de *log-rank* aplicado deu valor de 0,0769. 1- expressou e 0- não expressou

Gráfico 5.7- Curvas de Kaplan-Meier, mostrando maior sobrevida para o grupo que expressou a var8 (média 68 meses) e conseqüentemente menor risco de óbito para esse grupo em relação ao grupo que não expressou essa variante (média 44 meses). O teste de *log-rank* aplicado deu valor de 0,0958. 1- expressou e 0- não expressou

Dessa maneira, a um nível de significância de 5%, apenas as variáveis pT e IVS se mostraram significantes, indicando que indivíduos pertencentes ao grupo T3/T4 têm 2,8X mais chance de óbito do que indivíduos do grupo T1/T2. Indivíduos

que apresentaram IVS têm 6,7X mais chance de óbito do que indivíduos que não apresentaram essa invasão (tabela 5.7).

Deve-se, no entanto, levar em consideração que os intervalos de confiança não têm muita precisão, indicando que este modelo é suficiente, sobretudo, para indicar que as características de pT e IVS são fatores de risco para o óbito, mas não é um modelo preditivo preciso.

Tabela 5.7- Resultado da regressão de Cox. E.P- erro padrão, Sig- significância, Exp (B)- exponencial de beta, IC- intervalo de confiança

		Estimativa	E. P.	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
						Inferior	Superior
	pT (T3/T4)	1,038	,515	,044	2,824	1,028	7,754
	Inv._VS	1,906	,705	,007	6,727	1,691	26,767

Tabela 5.8- Variáveis que não continuaram no modelo

Variáveis	Significância
pTNM	,802
Dif. Histol	,661
IVS	,973
VAR1	,916
VAR8	,645

Gráfico 5.8- Modelo de Cox para tamanho da lesão e invasão vascular sanguínea. O grupo T3/T4 (tamanho maior que 4 cm) apresenta maior risco de óbito em relação ao grupo T1/T2. O grupo que apresentou IVS apresenta maior risco de óbito em relação ao grupo sem essa característica

Gráfico 5.9- Teste *log-minus-log* de proporcionalidade para pT

5.3 Expressão da proteína do TGIF1

A relação das amostras parafinadas dos 46 pacientes portadores de CEB, seus dados clínicos, diferenciação histológica e graduação imunoistoquímica, estão apresentados no anexo H. As amostras referentes a esses pacientes estavam todas localizadas em região de língua e/ou assoalho, representadas predominantemente por homens (84,7%), brancos (82,6%), apresentado média de idade de 58,2 anos (n=44).

A diferenciação histológica dos tumores mostrou que 45,6% dos casos eram pobremente diferenciados (PD), 28,3% bem diferenciados (BD) e 26,1% moderadamente diferenciados (MD) (gráfico 5.10). Considerando-se os três grupos em conjunto, a graduação imunoistoquímica mostrou que 58,7% dos casos expressaram a proteína do TGIF1 em mais de 75% das células (grau III), 30,4% em 50-75% das células (grau II), 8,7% em até 50% das células (grau I) e 2,2% dos casos não apresentaram expressão protéica (grau 0) (gráfico 5.10).

Gráfico 5.10- Distribuição câncer bucal segundo diferenciação histológica e graduação imunistoquímica da marcação com o anticorpo TGIF1

De maneira geral, 93,3% dos casos apresentaram expressão da proteína no núcleo da célula (incluindo os casos que expressaram simultaneamente no citoplasma) e 71,1% apresentaram essa expressão no citoplasma (incluindo os casos que expressaram simultaneamente no núcleo) (gráfico 5.11). De maneira mais detalhada, 64,4% dos casos mostraram expressão da proteína tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula, 28,9% somente no núcleo e 6,7% somente no citoplasma (gráfico 5.11). A figura 5.7 ilustra a expressão da proteína do TGIF1 em algumas amostras. De maneira geral, houve uma expressão mais homogênea da proteína quando localizada no núcleo, ao passo que essa expressão foi de aspecto mais granular quando detectada no citoplasma da célula.

Gráfico 5.11- Expressão da proteína do TGIF1 segundo o compartimento celular (núcleo e/ou citoplasma)

Figura 5.7 - Expressão da proteína do TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca. (A) HE de mucosa de língua exibindo transição neoplásica e (B) IHQ em corte pareado de (A) exibindo área de expressão da proteína em todas as camadas do epitélio. (C) HE da mesma lesão e (D) corte pareado de (C) exibindo marcação da proteína no núcleo e citoplasma da célula. (E) HE de mucosa de assoalho de boca e (F) IHQ em corte pareado de (E) exibindo marcação da proteína sobretudo no núcleo da célula. (G) HE de mucosa de assoalho de boca e (H) IHQ em corte pareado de (G) exibindo marcação da proteína do TGIF1 sobretudo no citoplasma da célula. HE, 100X (A) e 200X (C, E, G). Streptavidina-Biotina, 100X (B) e 200X (D, F, H)

5.3.1 Análise estatística das reações de IHQ

Avaliamos de se existe ou não relação entre a expressão da proteína do TGIF1 com a diferenciação celular (PD, MD e BD), a graduação imunoistoquímica (0, I, II e III) e o compartimento celular (núcleo e citoplasma) (tabela 5.9).

Tabela 5.9- Resultado das associações entre a expressão da proteína do TGIF1 e as variáveis de interesse. Em negrito estão os casos com significância estatística ou com valores aproximados. Grad- graduação imunoistoquímica, dif. histol- diferenciação histológica, N- núcleo, C- citoplasma

Cruzamentos	Teste exato de Fisher p- valor $\leq 0,05$
Grad. <i>versus</i> dif. histol.	0,487
Grad. <i>versus</i> local (só N, só C, N/C)	0,161
Grad. <i>versus</i> N	0,073
Grad. <i>versus</i> C	0,99
Dif. histol. <i>versus</i> local (só N, só C, N/C)	0,05
Dif. histol. <i>versus</i> N	0,229
Dif. histol. <i>versus</i> C	0,052
N <i>versus</i> C	0,546

Houve diferença estatística entre a diferenciação histológica e a localização da proteína do TGIF1 na célula, de maneira que, a maioria dos casos PD mostrou expressão nuclear e citoplasmática simultaneamente, ao passo que, a maioria dos casos BD mostrou marcação nuclear exclusivamente (tabela 5.9 e 5.10).

A detecção citoplasmática da proteína do TGIF1 foi observada, principalmente, nas amostras PD (p-valor 0,052), assim como a detecção nuclear, de maneira geral, foi observada em amostras grau III (marcação acima de 75% das células) (p-valor 0,073). Apesar de ambas as situações não terem mostrado diferença estatística, seus p-valores foram bastante aproximados do nível de significância estabelecido (tabelas 5.9, 5.11 e 5.12).

Tabela 5.10- Associação da expressão protéica do TGIF1, considerando-se a diferenciação histológica e o compartimento celular

			Compartimento Celular			Total	
			Só Núcleo	Núcleo e citoplasma	Só Citoplasma		
Diferenciação histológica	PD	N	3	17	1	21	
		% dentro Compartimento Celular	23,10%	58,60%	33,30%	46,70%	
		Resíduo	-2	2,2	-0,5		
		N	3	6	2	11	
	MD	% dentro Compartimento Celular	23,10%	20,70%	66,70%	24,40%	
		Resíduo	-0,1	-0,8	1,8		
		BD	N	7	6	0	13
			% dentro Compartimento Celular	53,80%	20,70%	0,00%	28,90%
	Resíduo		2,4	-1,6	-1,1		
	Total		N	13	29	3	45
	Teste Exato de Fisher p-valor = 0,05		% dentro Cito e Núcleo	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tabela 5.11- Associação da expressão protéica do TGIF1, considerando-se a diferenciação histológica e o citoplasma exclusivamente

			Diferenciação histológica			Total
			PD	MD	BD	
Citoplasma Geral	Não	N	3	3	7	13
		% dentro Diferenciação histológica	14,30%	27,30%	53,80%	28,90%
		Resíduos	-2	-0,1	2,4	
	Sim	N	18	8	6	32
		% dentro Diferenciação histológica	85,70%	72,70%	46,20%	71,10%
		Resíduos	2	0,1	-2,4	
Total		N	21	11	13	45
		% dentro Diferenciação histológica	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Teste Exato de Fisher p-valor = 0,052						

Tabela 5.12- Associação da expressão protéica do TGIF1, considerando-se a graduação imunoistoquímica e o núcleo exclusivamente

			Graduação			Total
			I	II	III	
Núcleo Geral	Não	N	1	2	0	3
		% dentro Graduação	25,00%	14,30%	0,00%	6,70%
		Resíduos	1,5	1,4	-2,2	
	Sim	N	3	12	27	42
		% dentro Graduação	75,00%	85,70%	100,00%	93,30%
		Resíduos	-1,5	-1,4	2,2	
Total		N	4	14	27	45
Teste Exato de Fisher p-valor = 0,073		% dentro Graduação	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

6 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho procuramos verificar se existe expressão diferencial entre 6 das 8 variantes transcricionais (mRNAs) descritas para o gene homeobox TGIF1 em pacientes portadores de carcinomas epidermóides de boca (CEB), além de verificar qual o impacto dessa expressão em relação ao prognóstico desses pacientes. Infelizmente, 2 variantes transcricionais foram excluídas do estudo por limitações inerentes às suas características genéticas. A hipótese da participação de transcritos do TGIF1 na carcinogênese oral teve por base o fato de transcritos desse gene terem sido encontrados durante o projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço” realizado pelo Instituto Ludwig de São Paulo em 2001. Esse projeto envolveu a análise genômica detalhada de transcritos derivados de tecidos tumorais e não tumorais de boca, laringe, faringe e tireóide. Posteriormente, a expressão de transcritos desse gene, em carcinomas epidermóides de boca, foi observada em estudos realizados em nosso laboratório (Matizonkas-Antonio, 2005). Considerando-se o papel relevante de variantes transcricionais para o entendimento de processos fisiológicos e, conseqüentemente, de mecanismos relacionados à iniciação e progressão de doenças, aliado ao fato de que o gene TGIF1 possui oito variantes transcricionais, resolvemos pesquisar a freqüência de expressão dessas variantes no carcinoma epidermóide de boca.

Infelizmente, o CEB representa um sério problema de saúde pública devido às suas altas taxas de morbidade e mortalidade e, a despeito das vastas pesquisas e dos avanços na área de oncologia e cirurgia, a sua taxa de mortalidade praticamente permanece inalterada, o que motiva cada vez mais a busca por marcadores

biológicos relevantes, com impacto direto no manejo individual desses pacientes (BEENKEN et al., 2003). Nesse aspecto, destacamos o estudo do gene homeobox TGIF1.

De maneira geral, alterações na expressão do TGIF1 pode ter implicações em diversos processos fisiológicos normais e, principalmente naqueles relacionados à carcinogênese. A proteína do TGIF1, em humanos, é um importante fator de transcrição envolvido em diversas vias de sinalização tais como do ácido retinóico, TGF- β , e EGF-Ras-MAPkinase (BERTOLINO et al., 1995; WOTTON et al., 1999; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001). Ao contrário de algumas espécies, como a dos camundongos, o gene TGIF1 humano realiza o processo de *splicing* alternativo, indicando seu papel relevante em relação à fisiologia normal de nossa espécie (<http://ncbi.nlm.nih.gov> GeneID: 21815, NM_009372).

Para caracterização das variantes transcricionais do TGIF1, observamos que todas elas são diferenciadas através de exons localizados em suas regiões N-terminais, ao passo que todas possuem em comum os exons 8 e 9, localizados em sua região C-terminal. Ao analisarmos as características genéticas dessas 8 variantes, verificamos, através do alinhamento entre elas, que as variantes que possuem regiões codificantes iniciais em comum, são exatamente aquelas que codificam as mesmas isoformas protéicas, de maneira que a isoforma “a” é codificada exclusivamente pela var1, a isoforma “b” exclusivamente pela var2 (ambas sem regiões codificantes iniciais comuns), a isoforma “c” codificada tanto pela var3 quanto pela var4 (ambas possuem regiões codificantes iniciais localizadas no exon 5 de sua região N-terminal) e a isoforma “d” codificada por qualquer uma das variantes de 5 a 8 (todas essas variantes possuem regiões codificantes iniciais localizadas na região C-terminal). Vale ressaltar que, apesar das variantes 5 a 8

serem diferenciadas exclusivamente por suas regiões UTR (“untranslated region” ou regiões não codificantes) localizadas na região N-terminal, elas provavelmente possuem características de maior ou menor estabilidade conferidas por suas regiões UTR, como relatado para outros transcritos. (PAVITHRA et al., 2007).

A identificação de alterações genéticas associadas ao câncer tem sido a base para o entendimento dos vários processos pelos quais células normais adquirem comportamento maligno. Muitas dessas alterações genéticas têm sido estudadas através da comparação entre células e/ou tecidos tumorais e células e/ou tecidos não tumorais (ARORA et al., 2005; CHEN et al., 2007, TAKAHASHI et al., 2007). Nesse aspecto, Chang et al. (1998), demonstraram que a maioria dos membros do grupo Hox estava expressa na pele normal de camundongos, enquanto seu repertório era substancialmente limitado em papilomas e carcinomas, com silenciamento completo de todo o grupo HOXD. Outros trabalhos, por outro lado, demonstraram que o ganho de expressão de genes homeobox pode contribuir para processo neoplásico. Um recente estudo em carcinoma de esôfago mostrou níveis de expressão significativamente elevados em 24 dos 39 genes HOX e nos genes CDX1, CDX2 e PDX1 em comparação a mucosa normal (TAKAHASHI et al., 2007).

Em nosso estudo, ao compararmos amostras congeladas de tumores primários de CEB e mucosas de tecidos orais morfológicamente normais não encontramos diferença na frequência de expressão para nenhuma das variantes transcricionais analisadas, apesar das variantes 4 e 8 apresentarem p-valores próximos do estabelecido. No entanto, devemos considerar que as amostras de “tecidos não tumorais” utilizadas nesse estudo são provenientes de margens morfológicamente dentro da normalidade de pacientes portadores de CEB. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de existirem alterações genéticas nessas amostras.

Em função de nossa metodologia não permitir uma avaliação da quantidade de transcritos expressos nessas amostras, não se pode afastar a possibilidade de existirem diferenças quantitativas dessas variantes entre si, de maneira a influenciar a quantidade e/ou nível de proteínas codificadas e, portanto, a sua função. Vale ressaltar que, em nosso estudo piloto, encontramos diferença estatística para a expressão da var7 quando comparamos 25 amostras de CEB e 16 de TN, de maneira que a frequência de expressão dessa variante foi maior nas amostras de CEB. Porém, as amostras utilizadas nesse piloto foram em tecidos que não foram submetidos a qualquer tipo de microdissecção. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de amplificação das variantes em tecidos adjacentes, como glândula salivar, tecido muscular e adiposo e infiltrado inflamatório nessas amostras.

A literatura aponta inúmeros trabalhos relacionando diferentes cânceres a variantes específicas. Como exemplo clássico, citamos variantes derivadas da glicoproteína de membrana CD44, principalmente a sua variante 6 (CD44v6), a qual já foi correlacionada à progressão tumoral e metástase. Em modelos animais a CD44v6 parece ter papel significativo na metástase tumoral de carcinoma pancreático (GUNTHER et al., 1991). Além disso, análises do soro de pacientes com câncer gástrico mostraram elevados níveis de CD44v6, o que foi correlacionado com invasão tumoral, metástase e maior envolvimento linfonodal. (HARN et al., 1996). Em câncer de mama, a superexpressão de CD44v6 foi relacionada à transformação maligna epitelial (HERRERA-GAYOL & JOTHY, 1999), porém, existem relatos indicando uma favorável associação prognóstica entre a expressão da CD44v6 e o não envolvimento linfonodal de pacientes com câncer de mama primário (FOEKENS et al., 1999). Por outro lado, WEG-REMERS et al. (1998),

relataram um significativo decréscimo da CD44v6 em tumores metastáticos primários e em metástases de carcinomas coloretais.

Curiosamente, muitos relatos apontam efeitos aparentemente antagônicos das mesmas variantes em diferentes órgãos. Isso provavelmente acontece porque o processo de *splicing* alternativo ocorre de maneira predeterminada de acordo com o tipo de célula, o tecido de origem, o tempo e o estágio de diferenciação celular (STAMMM et al., 2005). Portanto, qualquer alteração que leve ao desequilíbrio desse processo pode resultar na expressão inadequada de variantes em momentos, locais e concentrações “inadequadas”, favorecendo o surgimento de neoplasias. Infelizmente poucos estudos relacionam o envolvimento de variantes de *splicing* com carcinomas de boca. No trabalho de ITO et al. (1999), foi relatado que baixos níveis de Bax- α (variante relacionada à morte celular) foram correlacionados com pior prognóstico em carcinomas orais e oro-faríngeos.

Avaliando a relação das variantes entre si dentro do grupo de CEB, verificamos que algumas mostraram forte associação estatística, como observada, por exemplo, entre as variantes 1X4, 1X8, 2X4, 4X5 e 4X8, o que significa que elas possuem comportamentos semelhantes e provavelmente atuam conjuntamente na neoplasia. É interessante notar que as associações encontradas foram de variantes que codificam diferentes isoformas protéicas, diferentemente da relação fisiologicamente esperada entre variantes que codificam as mesmas proteínas, como por exemplo, entre as variantes 5 a 8 que são semelhantes geneticamente por codificarem a mesma isoforma protéica “d”, porém, não apresentaram qualquer relação nas amostras de CEB analisadas. Isso provavelmente ocorre em decorrência de alterações genéticas que favorecem a expressão conjunta de determinadas variantes em detrimento de outras.

Diversos trabalhos têm relacionado o grau de diferenciação histológica com a expressão de genes homeobox. Nesse aspecto, Rieger et al. (1994), observaram expressão predominante do gene HOXC4 em queratinócitos diferenciados, ao passo que em células mais indiferenciadas (neoplásicas), o gene mostrava-se com baixa expressão. Em nosso estudo procuramos relacionar, além da diferenciação histológica, a expressão das variantes do TGIF1 com vários outros aspectos. Não encontramos diferença estatística quando correlacionamos a expressão das variantes transcricionais do TGIF1 com idade e sexo dos pacientes e com localização anatômica, tamanho, *status* nodal, diferenciação histológica, estadiamento patológico e invasões perineural, vascular sanguínea e vascular linfática das amostras de CEB. Porém os resultados em relação a algumas dessas correlações apresentaram p-valores bem baixos, a exemplo da var1 *versus* pT (tamanho até 4 cm foi o que mais expressou a var1), var8 *versus* idade (principalmente pacientes de 40 a 60 anos foram o que mais expressaram a var8) e var8 *versus* diferenciação histológica (os casos MD-PD foram os que mais expressaram a var8).

Por outro lado, as vars 1 e 8 tiveram correlação estatística univariada em relação a sobrevida dos pacientes, de maneira que o grupo de indivíduos que apresentou sobrevida maior foi o grupo que mais expressou a var1 em relação ao que menos expressou essa variante, da mesma forma que, o grupo de indivíduos que apresentou sobrevida maior foi o grupo que mais expressou a var8, em relação ao que menos expressou essa variante. Dessa maneira, os grupos que apresentaram maior expressão para ambas as variantes possuem menores riscos de óbito. É Interessante lembrar, como já citado anteriormente, que as variantes 1 e 8, mostraram forte relação estatística entre si, e portanto, ambas podem estar

associadas de maneira semelhante a um prognóstico mais favorável em pacientes portadores de CEB.

Sabe-se que genes homeobox têm mostrado padrões de expressão órgãos-específicos, que persistem durante a transformação neoplásica. Essa propriedade sugere que a análise da sua expressão em neoplasias pode ser extremamente útil para o diagnóstico e avaliação da lesão primária, além de servir como sonda para a detecção de metástases de origens desconhecidas (CHEN; SUKUMAR, 2003; TAKAHASHI et al., 2004). Redline et al. (1994), mostraram que tumores malignos apresentavam desregulação de genes HOX importantes na sua histogênese, servindo de indicador confiável do subtipo histológico em uma variedade de tumores, e, em alguns casos, representavam ferramentas diagnósticas muito úteis.

De maneira geral, existe uma dificuldade em se definir as vias de sinalização localizadas a montante e a jusante dos genes homeobox, dificultando inclusive uma análise funcional mais adequada. Essa dificuldade é parcialmente devida à simplicidade de motivos de ligação do núcleo (ATTA), presentes em muitos promotores genéticos, o que pode potencialmente oferecer áreas de ligação para muitas proteínas que possuem homeodomínio (CHEN; SUKUMAR, 2003). Além disso, para um melhor entendimento sobre o papel de genes homeobox na carcinogênese, é necessário esclarecer de que maneira ocorre cooperação entre esses genes na regulação da proliferação e diferenciação celular, se suas proteínas atuam somente como fatores de transcrição e se o seu homeodomínio é necessário para todas as suas funções (CHEN; SUKUMAR, 2003). Apesar de termos encontrado relação entre as variantes 1 e 8 nas amostras de CEB, nossa abordagem metodológica não nos permite avaliar de que maneira elas poderiam cooperar na carcinogênese oral, porém, vale frisar que, possivelmente, essas

variantes poderiam estar relacionadas a um prognóstico mais favorável para os pacientes portadores de CEB, já que a maior expressão de cada uma delas foi relacionada com uma maior sobrevida e, portanto, menor risco de óbito.

Interessante notar que os mesmos genes também podem estar desregulados em diferentes neoplasias, cujo exato papel pode variar de câncer para câncer, não havendo condições de estabelecer, na realidade se sua ação é causa ou consequência nessas situações (ABATE-SHEN, 2002, ABATE-SHEN, 2003; CARÉ et al., 1996). De maneira geral, a maioria dos cânceres que apresentam expressão desregulada de genes homeobox segue uma simples regra: genes normalmente expressos durante a embriogênese apresentam ganho de expressão no câncer, enquanto aqueles que estão normalmente expressos durante a diferenciação ou em tecidos diferenciados, estão com baixa expressão nessas lesões (ABATE-SHEN, 2002). Em nosso estudo, não encontramos diferença estatística das variantes do TGIF1 entre os grupos CEB e TN, porém a var4 foi a que apresentou p-valor mais baixo, de forma que tendeu a mostrar maior expressão em amostras de TN. De acordo com a teoria de ABATE-SHEN (2002), o fato da var4 estar expressa principalmente em tecido diferenciado normal, levaria a sua baixa expressão em tecidos neoplásicos, o que demonstraria uma possível função supressora tumoral para ela.

Apesar de muitos estudos relatarem a expressão desregulada e diferencial de genes homeobox em uma gama de neoplasias, realmente poucos deles estabeleceram papéis funcionais desses genes na carcinogênese. Recentemente, os genes HOXC10, HOXC6 e HOXD13 foram encontrados superexpressos em linhagens celulares de carcinomas epidermóides invasivos de colo de útero em relação a neoplasias intra-epiteliais cervicais, porém desses genes analisados,

somente o HOXC10 estava aparentemente associado, em termos funcionais, a progressão de neoplasias intra-epiteliais cervicais para carcinomas invasivos (ZHAI et al., 2007).

Mutações no gene TGIF1 foram relacionadas à etiopatogenia da holoprocencefalia, a anormalidade cerebral mais comum (GRIPP et al., 2000), coerente com sua função em condições normais, que está relacionada, sobretudo, ao desenvolvimento cerebral. Potenciais mutações desse gene também foram relacionadas à miopia avançada (SCAVELLO et al., 2004), porém sem resultados conclusivos. Em relação à associação do TGIF1 com o processo de carcinogênese mais especificamente, foram encontradas até o momento associações com leucemias e cânceres de esôfago, fígado e estômago (NAKAKUKI et al., 2002; BORLAK et al., 2005; HU et al., 2005; HAMID; PATHERSON; BRANDT, 2007), porém nenhum desses estudos estabelece papéis definitivos para esse gene. No entanto, vale ressaltar que o TGIF1 pode induzir, pelo menos em parte, a diferenciação de queratinócitos (HU et al., 2005), o que realmente sugere sua participação no processo de transformação maligna epitelial e até, possivelmente, em uma perda de sua expressão em células que sofreram transição epitélio-mesenquimal.

Nesse estudo abordamos pela primeira vez a relação entre as diferentes variantes transcricionais do TGIF1 em relação ao processo de carcinogênese. O único estudo encontrado abordando as variantes do TGIF1, foi um estudo japonês relacionado à miopia avançada (SCAVELLO et al., 2004).

O estudo de potenciais marcadores biológicos tumorais associados ao conhecimento dos fatores prognósticos do câncer é fundamental, sobretudo, para o planejamento terapêutico adequado. O fator de prognóstico isolado mais importante

no câncer de boca parece ser a metástase regional (envolvimento de linfonodos cervicais) o que torna esse diagnóstico fundamental para o planejamento do tratamento, no entanto os fatores que influenciam essa ocorrência ainda precisam ser esclarecidos (RUSSOLO et al., 2002; SHARA et al., 1984; WOOLGAR; SCOTT, 1995). Alguns dos fatores de risco relatados em função do envolvimento nodal estão relacionados à localização e tamanho tumoral, grau de diferenciação histológica, espessura do tumor (principalmente em região de língua e assoalho), embolização vascular e infiltração perineural (KOWALSKI; MEDINA, 1998).

O carcinoma epidermóide de boca continua apresentando prognóstico global sombrio e tendência elevada à recorrência local e regional (MOORE; JOHNSON; PIERCE, 2000; LEEMANS et al., 1994). Seus variáveis padrões de comportamento biológico dependem de fatores do hospedeiro e do tumor primário. Tipicamente, lesões T1 e T2 (até 4 cm) apresentam, respectivamente, 10 a 30% de risco de desenvolverem metástases regionais, enquanto lesões T3 e T4 apresentam riscos maiores de desenvolverem essas metástases (SHAH et al., 1976; LEEMANS et al., 1994). Sob outro aspecto, não está claro o porquê de alguns pacientes com doença local em estágio avançado (estágios 3 e 4) desenvolverem metástases regionais mais lentamente, enquanto outros com lesões mais precoces (estágios 1 e 2) evoluírem com envolvimento mais rápido e agressivo de linfonodos regionais. As amostras utilizadas em nosso estudo não permitem esse tipo de avaliação já que não foi o enfoque do nosso trabalho selecionar e agrupar as amostras visando à busca de marcadores de agressividade. Em termos de sobrevida, no entanto, apesar de termos encontrado correlação em relação ao tamanho da lesão e ao estadiamento patológico, curiosamente não encontramos quaisquer correlação da sobrevida desses pacientes em relação ao envolvimento de linfonodos.

Aparentemente não existe diferença prognóstica entre os sexos masculino e feminino, estando de acordo com os nossos achados, apesar de alguns autores relatarem menores taxas de sobrevida para as mulheres (LEITE; KOIFMAN, 1998). A correlação prognóstica em relação à idade parece controversa na literatura (MASSANO et al., 2005), porém em nosso estudo não encontramos diferença prognóstica entre o grupo de pacientes de 40-60 anos e entre o grupo com mais de 60 anos. Considerando que 91,5% dos pacientes incluídos nesse estudo estavam representados por tabagistas e/ou etilistas, não procedemos à associação entre a sobrevida desses pacientes e o consumo de álcool e tabaco.

Existem relatos mostrando maiores taxas de mortalidade em pacientes com carcinomas de língua em relação a carcinomas de lábio (LEITE; KOIFMAN, 1998). Nesse estudo não consideramos amostras de lábio, por possuírem etiopatogênese diferente em relação às regiões intra-orais. Outros autores não observaram diferenças na sobrevida de pacientes com carcinomas de língua e carcinomas localizados em outras regiões anatômicas intra-orais, tais como assoalho bucal, palato, mucosa jugal, trígono retromolar e gengiva (BELL et al., 2007), estando de acordo com os nossos achados em que não encontramos diferenças em relação à sobrevida de pacientes com lesões em língua e/ou assoalho em comparação aos outros sítios anatômicos, incluindo região retromolar, gengiva, palato e mucosa jugal.

De maneira geral, a sobrevida do paciente com câncer de boca é modificada de acordo com o estadiamento da doença. Quando a doença é local, a sobrevida é de 79%, na doença locoregional é de 42% e na presença de metástases distantes é de 19% (GLOECKER, 1994). Relatos mais recentes também apontam maiores taxa de sobrevida para lesões mais precoces em relação a lesões mais avançadas, com taxas variando de 75% a 13,1%, respectivamente (RIBEIRO; KOWALSKI;

LATORRE, 2000; LO et al., 2003). Em nosso estudo, também verificamos maiores taxas de sobrevida para pacientes com lesões mais iniciais (estádios I/II) em comparação a pacientes portadores de lesões em estádios mais avançados (estádios III/IV).

Muitos autores estabeleceram significativa correlação entre lesões de CEB pobremente diferenciadas em relação a um pior prognóstico, da mesma maneira que lesões bem diferenciadas estavam relacionadas a um melhor prognóstico (LO et al., 2003; TAKES, 2004), estando de acordo com nossos achados em que verificamos uma maior sobrevida para lesões bem diferenciadas em relação a lesões moderadamente e pobremente diferenciadas. Entretanto, outros autores não encontraram tal associação (LO et al., 2003; LEITE; KOIFMAN, 1998).

A invasão perineural aparentemente correlaciona-se com maior probabilidade de metástase regional e a distância, rápida invasão tumoral, pobre diferenciação histológica e menores taxas de sobrevida em 5 anos para pacientes portadores de CEB (RAHIMA et al., 2004). No entanto, nossos resultados não mostraram associação estatística entre a invasão perineural e a taxa de sobrevida para os pacientes portadores de CEB incluídos no estudo.

Não encontramos trabalhos que avaliassem as invasões vasculares, sanguínea e linfática, como fatores prognósticos do CEB. De qualquer maneira, verificamos, em nosso estudo, maiores taxas de sobrevida para pacientes que não apresentaram quaisquer dessas invasões.

Adicionalmente para fins de caracterização, verificamos o grau de instrução dos pacientes, de maneira que, somente 5% eram analfabetos, ao contrário do observado em outros estudos (LEITE; KOIFMAN, 1998), em que se observa elevado

índice de analfabetismo entre os pacientes, possivelmente influenciando no grau de intrusão e prevenção do câncer.

Em nosso estudo também avaliamos, de forma multivariada, a influencia das variantes 1 e 8, da diferenciação histológica, do tamanho da lesão, do estadiamento patológico e das invasões vasculares sanguíneas e linfáticas em relação ao desfecho óbito. Através dessa análise, somente o tamanho da lesão e a invasão vascular sanguínea tiveram significado estatístico, de maneira que os indivíduos pertencentes ao grupo T3/T4 (tamanho maior que 4 cm) possuem 2,8X mais chances de óbito em relação aos indivíduos do grupo T1/T2 (tamanho até 4 cm) e os indivíduos que apresentaram IVS positiva possuem 6,7X mais chances de óbito em relação aos indivíduos que não apresentaram essa invasão. Deve-se, no entanto, levar em consideração que os intervalos de confiança encontrados nessa análise deveriam ser relativamente menores, indicando que este modelo é suficiente, sobretudo, para indicar que as características de pT e IVS são fatores de risco para o óbito, mas não representa um modelo preditivo preciso.

Em nosso estudo, também incluímos a análise da expressão imunoistoquímica do TGIF1 em relação aos níveis protéicos e a localização celular (nuclear e/ou citoplasmática), utilizando amostras parafinadas de CEB em diferentes graus de diferenciação histológica. Nossos resultados não mostraram correlação entre os níveis de expressão da proteína (scores 0 a 3) e os diferentes graus de diferenciação histológica (PD, MD e BD), bem como entre os níveis de expressão protéica e o compartimento celular analisado. Porém, nossos resultados mostraram correlação entre a diferenciação histológica e o compartimento celular analisado, de maneira que, foi observada expressão principalmente nuclear da proteína do TGIF1

em amostras bem diferenciadas, ao passo que, em amostras pobremente diferenciadas, o citoplasma da célula também passou a expressar a proteína.

A distinção da expressão protéica do TGIF1 nos diferentes compartimentos da célula, pode ter implicações em termos de mecanismo de ação dessa proteína. Nesse aspecto, estudos recentes sugerem, por exemplo, que a diferença entre a expressão nuclear e citoplasmática da survivina (molécula inibidora da apoptose e reguladora da divisão celular) seria um indicador de sua atividade em células tumorais, de maneira que, a survivina citoplasmática interferiria na proteção contra a apoptose induzida pela quimio e radioterapia, servindo como marcador preditivo em pacientes submetidos a terapias multi-modais (ENGELS et al., 2007).

É aceito que a detecção da TGIF1 é constitutivamente nuclear (WOTTON et al., 1999), porém não encontramos nenhum trabalho na literatura que relatasse sua localização citoplasmática. Por exercerem função de fatores de transcrição, as proteínas dos genes homeobox, de maneira geral, estão expressas no núcleo da célula, no entanto, já foi relatada expressão imunoistoquímica das proteínas HOXA5 e D9 preferencialmente no citoplasma de células neoplásicas (TAKAHASHI et al., 2007).

Em nosso estudo, a proteína do TGIF1, em amostras bem diferenciadas, supostamente estaria exercendo seu papel fisiológico usual no núcleo da célula, ao passo que, em amostras pobremente diferenciadas, essa proteína poderia ter sofrido alguma modificação pós-traducional que tivesse influenciado no seu transporte ou até mesmo velocidade de migração do citoplasma ao núcleo da célula. Possivelmente, alguma mutação adicional poderia estar presente nessas células mais indiferenciados, favorecendo sua expressão citoplasmática, porém as únicas mutações do TGIF1 até o momento relatadas estão relacionadas a holoprocencefalia

(GRIPP et al., 2000). De qualquer maneira, o significado de nossos achados não pode ser totalmente esclarecido. Deve-se ainda levar em consideração que a correlação desses achados com as variantes transcricionais do TGIF1 não pode ser realizada, já que o único anticorpo disponível comercialmente e utilizado nesse estudo, reage com qualquer uma das 4 isoformas protéicas do TGIF1.

A busca de informações a respeito da genética do câncer está totalmente voltada para a identificação de potenciais marcadores biológicos, com vistas ao refinamento diagnóstico, e conseqüente identificação de importantes alvos terapêuticos. Em relação ao carcinoma epidermóide de boca, os resultados aqui apresentados em conjunto com os trabalhos anteriores (ZHU et al., 2004; MATIZONKAS-ANTONIO, 2005; HASSAM et al., 2006) sugerem que alguns membros da família dos genes homeobox (Quox-1, alguns membros HOX e o TGIF1) possuem papel importante na carcinogênese de boca.

Em nosso trabalho verificamos que variantes transcricionais do gene TGIF1 estão expressas diferentemente em pacientes portadores de CEB e levantamos a hipótese de que a expressão das variantes 1 e 8 estão relacionadas, de maneira semelhante, a um melhor prognóstico para esses pacientes. Adicionalmente, sugere-se que o tamanho da lesão e a invasão vascular sangüínea representem importantes fatores de risco para a carcinogênese oral.

7 CONCLUSÕES

7.1 Não existe diferença na frequência de expressão das variantes transcricionais do gene TGIF1 em relação aos grupos CEB e TN.

7.2 Existe relação significativa entre as variantes 1X4, 1X8, 2X4, 4X5 e 4X8 no grupo de CEB, o que significa que elas possuem comportamentos semelhantes e provavelmente atuam conjuntamente na neoplasia.

7.3 Não foi observada relação entre as variantes transcricionais do TGIF1 e os aspectos clínicos e histológicos dos pacientes portadores de CEB analisados.

7.4 Sugere-se que a expressão das variantes 1 e 8 estejam relacionadas, de maneira semelhante, a um melhor prognóstico para pacientes portadores de CEB.

7.5 Sugere-se que a expressão simultânea da proteína do TGIF1 tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula esteja correlacionada a lesões pobremente diferenciadas.

REFERÊNCIAS¹

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

Abate-Shen C. Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune. *Cancer Cell* 2003;4:329-30.

American Cancer Society. American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 5th ed. Chicago: Lippincott- Ravan;1997.

Anbazhagan R, Raman V. Homeobox genes: molecular link between congenital anomalies and cancer. *Eur J Cancer* 1997;33(4):635-7.

Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science;1994.

Arora S, Matta A, Shukla NK, Deo SVS, Ralhan R. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* 2005;42:97–108.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World health organization classification of tumours- pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon:IARC Press, 2005. cap 4, p.163-208.

Bartholin L, Powers SE, Melhuish TA, Lasse S, Weinstein M, Wotton D. TGIF Inhibits Retinoid Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(3):990-1001.

Beenken SW, Urist MM. Head and neck tumors. In: Way LW, Doherty GM, editors. Current surgical diagnosis and treatment. 11th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2003. p. 282-97.

Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BP. Tongue Cancer: Is There a Difference in Survival Compared With Other Subsites in the Oral Cavity? *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:229-36.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura 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.

Birman EG, Sugaya NN. Diagnóstico diferencial. In: Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 11, p.80-6.

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

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 tumours. *Oncogene* 2005;24(11):1809-19.

Brandão LG, Cavaleiro BG, Sondermann A. Apresentação clínica e estadiamento. In: Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 10, p.71-9.

Brasil. Ministério da saúde. Instituto nacional do câncer - INCA. Falando sobre o câncer de boca. 2002. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/falandosobrecancerdeboca.pdf> [2004 jul. 6].

Brennan J, Boyle J, Kock W, Goodman S, Hruban R, Eby Y. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in head and neck squamous carcinoma. *N Engl J Med* 1995;332:712-7.

Brener S, Jeunon FA, Barbosa AF, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão da literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Canc* 2007;53(1) :63-9.

Brinkman BMN. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* 2004;37:584–94

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.

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

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.

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 H, Sukumar S. Hox genes: emerging stars in cancer. *Cancer Biol Therapy* 2003;2(4):524-5.

Chen Y, Knosel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Paterson I. Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer* 2007;55(3):287-94.

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

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

Colosimo EA, Giolo SR. *Análise de Sobrevivência Aplicada*. Editora Blucher, 2006.

Cox DR. Regression Models and Life-tables. *J Royal Stat Soc* 1972;34:187-220.

Das N, Majumder ND, DasGupta UB. *Ras* gene mutations in oral cancer in eastern India. *Oral Oncol* 2000;36:76-80.

Dash A, Gilliland D. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematology* 2001;14(1):49-64.

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

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29(2):117-29.

Early P, Rogers J, Davis M, Calame K, Bond M, Wall R, et al. Two mRNAs can be produced from single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* 1980;20(2):313-9.

Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, et al. Pax genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 2002;46:535-44.

Edelman GM, Jones FS. Outside and downstream of the homeobox. *J Biol Chem* 1993;268(28):20683-6.

Engels K, Knauer SK, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J Pathol* 2007;211(5):532-40.

Epstein J, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas R. Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 1994;269(11):8355-61.

Ferreira EM, Galante PAF, Carraro DM, Souza SJ. Alternative splicing: a bioinformatics perspective. *Mol. BioSyst* 2007;3:473–7.

Foekens JA, Dall P, Klijn JGM, Skroch-Angel P, Claassen CJC, Look MP, et al. Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 1999;84:209–15.

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

Gehring WJ. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New York: Vail-Ballou Press, 1998. cap 2-3, p.21-53.
Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4(5):361-70.

Gilbert SF. Developmental biology. 6th ed. Sinauer; 2000. part 2. Chap.9. Disponível em: URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=genes+homeoticos+AND+dbio%5Bbook%5D+AND+131567%5Buid%5D&rid=dbio.section.1971#2009> [2007 out. 24].

Gloecker RLA. SEER cancer statistics review, 1973-1991. Bethesda MD: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Cancer Institute 1994. Report no. NIH-94-2789.

Goodman FR. Limb malformations and the human HOX genes. *Am J Med Genet* 2002;112:256-65.

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

Guazzi S, Pintonello ML, Viganò A, Boncinelli E. Regulatory interactions between the human HOXB1, HOXB2, and HOXB3 proteins and the upstream sequence of the Otx2 gene in embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273(18):11092-9.

Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 1994;269(22):15399-402.

Guimarães GS, Latini FR, Camacho CP, Maciel RM, Dias-Neto E, Cerutti JM. Identification of candidates for tumor-specific alternative splicing in the thyroid. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(6):540-53.

Gunthert U, HoVmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Matzku S et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65:13-24.

Hamid R, Patherson J, Brandt S. Identification of a clinical and biological role for TGIF in leukemogenesis and hematopoiesis. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2007, San Diego.

Harn HJ, Ho L, Shyu RY, Yuan JS, Lin FG, Young TH et al. Soluble CD44 isoforms in serum as potential markers of metastatic gastric carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1996;22:107–10.

Hassam NMM, Hamada JI, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M et al. Aberrant Expression of HOX Genes in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma Tissues. *Oncology Res* 2006;16:1–8

Herrera-Gayol A, Jothy S. Adhesión proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *Experim Mol Pathol* 1999;66:149-56.

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.

Hyndman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, et al. Impact of DNA amplification on gene patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:6240-5.

INCA – Instituto Nacional do Câncer: estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2008. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008> [2007 dez.19]

Ito T, Fujieda S, Tsuzuki H, Sunaga H, Fan G, Sugimoto C, et al. Decreased expression of bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 1999;140:81–91.

Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Liu DD, den Hollander PL, Babenko IM, Keck J. Cyclin D1 genotype, response to biochemoprevention, and progression rate to upper aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:198-205.

Johnson N. Orofacial neoplasms: global epidemiology, risk factors and recommendation for research. *Int Dent J* 1991;41:365.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1599-1605.

Kowalski LP, Medina JE. Nodal metastases: predictive factors. *Otolaryngol Clin North Am* 1998;(4):621-37.

Kume T, Oshima K, Shinohara T, Takeo H, Yamashita Y, Shirakusa T, et al. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein Barr virus associated gastric carcinoma. *Histopathology* 1999;34:502–9.

Laboratório de Bioinformática- Ewha Womans University. Disponível em: URL: (<http://genome.ewha.ac.kr/ASePCR>).

Laerm A, Helmbold P, Goldberg M, Dammann R, Holzhausen HJ, Balhausen WG. Prospero-related homeobox 1 (PROX1) is frequently inactivated by genomic deletions and epigenetic silencing in carcinomas of the biliary system. *J Hepatol* 2007;46(1):89-97.

Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 1999;140(3):1416-22.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.

Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 1996;14:281-91.

Leemans C, Tiwari R, Nauta J, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastasis as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73:187.

Leite ICG, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol* 1998;34:347-52.

Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1199-205.

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

Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RCS. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:751-8.

Magalhães RP, Magalhães MHCG. Carcinógenos bucais. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 3, p.16-22.

Mao L, Lee J, Fan Y, Ro J, Batsakis J, Lippman S, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignancies. *Nat Med* 1996;2:682-5.

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

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.

Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1):67-76.

Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J* 1993;12:2361-7.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-35.

Mitteldorf CATS. Anatomia patológica no câncer de boca. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 13, p.96-100.

Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 2002;30(1):13-9.

Mohit-Tabatabai M. Relation of Thickness of Floor of Mouth Stage I and II Cancers to Regional Metastasis. *Am J Surg* 1986;152:351-3.

Moore S, Johnson N, Pierce A. The epidemiology of mouth cancer. *Oral Dis* 2000;6:65.

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.

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

NCBI. National Cancer for Biotechnology Information. Disponível em: URL: (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral & maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. cap. 10, p.287-96.

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

Ogbureke KU, Nikitakis NG, Warburton G, Ord RA, Sauk JJ, Waller JL, et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. *Oral Oncol* 2007;43(9):920-32.

Okumura M, Kondo S, Ogata M, Kanemoto S, Murakami T, Yanagida K, et al. Candidates for tumor-specific alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;334:23–9.

Pavithra L, Rampalli S, Sinha S, Sreenath K, Pestell RG, Chattopadhyay S. Stabilization of SMAR1 mRNA by PGA2 involves a stem loop structure in the 5' UTR. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(18):6004-16.

Patel SG, Shah JP. IN. Results of treatment. In: Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG (eds.). *Oral Cancer*. London: Martin Dunitz; 2003, p.387-94.

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) :6198-203.

Pomerantz RG, Grandis JR. The role of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2003;5:140-6.

Qiu M, Anderson S, Chen S, Meneses JJ, Hevner R, Kuwene E, et al. Mutation of the Emx-1 homeobox gene disrupts the corpus callosum. *Develop Biol* 1996;178:174-8.

Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:423-31.

Redline RW, Hudock P, MacFee M, Patterson P. Expression of AbdB-type homeobox genes in human tumors. *Lab Invest* 1994;71(5):663-70.

Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Impact of comorbidity, symptoms, and patients_ characteristics on the prognosis of oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:1079-85.

Rieger E, Bijl JJ, van Oostveen JW, Soyer HP, Oudejans CBM, Jiwa NM, et al. Expression of the homeobox gene HOXC4 in keratinocytes of normal skin and epithelial skin tumors is correlated with differentiation. *J Invest Dermatol* 1994;103(3):341-6.

Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A et al. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res* 2007;67(4):1527-35.

Russolo M, Giacomarra V, Papanikolla L, Tirelli G. Prognostic indicators of occult metastases in oral cancer. *Laryngoscope* 2002;112:449-52.

Sabbaga J. Oncogenes e antioncogenes. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 4, p.23-8.

Scavello GS, Paluru PC, Ganter WR, Young TL. Sequence variants in the transforming growth beta-induced factor (TGIF) gene are not associated with high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2091-7.

Schully C, Field FK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000; 36:311-27.

Shah J, Cendon R, Farr H, Strong EW. Carcinoma of the oral cavity. Factors affecting treatment failure at the primary site and neck. *Am J Surg* 1976;132:504-7.

Shara AR, Spiro R, Shah J, Strong E. Squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg* 1984;148:455-64.

Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:807-20.

Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998;51(4):191-200.

Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002;20:2672-9.

Squarize CH, Castilho RM, Pinto Jr. DS. Immunohistochemical evidence of *PTEN* in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 2002;31:1-6.

Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci*. 2006;119:2635-41.

Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D. Function of alternative splicing. *Gene* 2005;344:1-20.

Takahashi C, Akiyama N, Kitawama H, Takai S, Noda M. Possible involvement of *Msx-2* homeoprotein in v-ras-induced transformation. *Leukemia* 1997;Suppl 3:340-3.

Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y, et al. Dysregulated expresión of *HOX* and *ParaHOX* genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 17(4):753-60.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa, Takada M, Tada M, Nogami I, et al, Expression profiles of 39 *HOX* genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Exp Cell Res* 2004; 293:144-53.

Thomas BL, Liu JK, Rubenstein JLK, Sharpe PT. Independent regulation of *Dlx2* expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch. *Development* 2000;127:217-24.

Takes RP. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: Imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol* 2004;40:656-67.

Troubleshooting for PCR and multiplex PCR. Disponível em: URL: <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html> [2003 set. 5].

Tsujimoto Y, Croce C. M. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83: 5214–8.

UICC. Union Internacionale Contra le Cancer. Atlas TNM: Guia ilustrado para classificação TNM/pTNM de tumores malignos. São Paulo: Fundação Oncocentro; 1992.

Ulrich CM. Folate and cancer prevention: a closer look at a complex picture. *Am J Clin Nutr* 2007;86:271-3.

Uzawa N, Sonoda I, Myo K, Takahashi KI, Miyamoto R, Amagasa T. Fluorescence in situ hybridization for detecting genomic alterations of cyclin D1 and p16 in oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2007;110(10):2230-9.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-51.

Wawersik S, Maas RL. Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Human Mol Genet* 2000;9(6):917-25.

Weg-Remers S, Anders M, von Lampe B, Riecken EO, Schuder G, Feifel G et al. Decreased expression of CD44 splicing variants in advanced colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 1998;34(10):1607-11.

Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of the mouth. *Head Neck* 1995 ;17(6):463-72.
Wotton D, Lo RS, Swaby LC, Massagué J. Multiple 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.

Wuyts W, Reardon W, Preis S, Homfrey T, Rasore-Quartino A, Christian H, et al. Identification of mutations in the MSX2 homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. *Human Genet* 2000;9(8):1251-5.

Xerri L, Hassoun J, Devillard E, Birnbaum D, Birg F. Bcl-x and the apoptotic machinery of lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 1998;28:451-8.

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

Zhai Y, Kuick R, Nan B, Ota I, Weiss SJ, Trimble CL, et al. Gene Expression Analysis of Preinvasive and Invasive Cervical Squamous Cell Carcinomas Identifies HOXC10 as a Key Mediator of Invasion. *Cancer Res* 2007;67(21):10163-72.

Zhang WG, Ma LP, Wang SW, Zhang ZY, Cao GD. Antisense bcl-2 retrovirus vector increases the sensitivity of a human gastric adenocarcinoma cell line to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1999;69:582–6.

Zhu F, Li J, Li WX, Liu ZC, Long X. Overexpression and clinicopathological significance of homeobox gene Quox-1 in oral squamous cell carcinoma. *J Biochem Mol* 2004;37(6):671-5.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 76/06

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa "Expressão de variantes transcricionais do gene homeobox TGIF em carcinomas epidermóides de boca", de responsabilidade da Pesquisadora Tatiana Nayara Libório dos Santos, sob orientação do Professor Doutor Fábio Daumas Nunes.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 01 de agosto de 2006

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Parecer do comitê de ética do Hospital Ac Camargo

**Comitê de Ética em Pesquisa
CEP**

São Paulo, 09 de outubro de 2006.

Ao
Dr. Fábio Daumas Nunes

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 819/06
“Expressão de variantes transcricionais do gene homeobox TGIF em carcinomas epidermóides de boca”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo, em sua última reunião de 26/09/2006, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 29/08/2006, aprovaram a realização do projeto em referência, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- ✓ Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos;
- ✓ Orçamento detalhado do estudo;
- ✓ Carta de Comprometimento da Pesquisadora em devolver o material retirado da Instituição;
- ✓ Carta de Comprometimento do Departamento de Cabeça e Pescoço;
- ✓ Carta de Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dra. Vilma Regina Martins
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer consubstanciado do Hospital Ac Camargo

**PARECER CONSUBSTANCIADO
RESPOSTA ÀS PENDÊNCIAS**

PROJETO: CEP 819/06

TÍTULO: Expressão de variantes transcricionais do gene homeobox TGIF em carcinomas epidermóides de boca.

ÁREA: Odontologia

ALUNO: Tatiana Nayara Libório dos Santos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

RESPONSÁVEL NA INSTITUIÇÃO: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

DATA: 29/08/06

Comentários gerais:

Tendo respondido às pendências, conforme solicitado, mais especificamente, informando tempo de pesquisa, critérios de inclusão e exclusão, estabelecendo a correção do termo de consentimento livre e esclarecido, segue parecer:

PARECER FINAL:

Aprovado

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
Hospital do Câncer A.C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dra. Vilma Regina Martins
Vice - Coordenadora

ANEXO C – Ficha clínica do paciente

FICHA CLÍNICA DO PACIENTE

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Classificação TNM: _____

Tempo de evolução da lesão: _____

Localização da lesão: _____

História familiar de câncer: Parentesco

Câncer

Etilista ()sim ()não

Tabagista ()sim ()não

ANEXO D - Dados clínicos e anátomo-patológicos dos pacientes com CEB

Anexo D: Dados clínicos e anátomo-patológicos dos 48 pacientes com CEB. Sexo: M: masculino e F: feminino, NI: não informada, Local: ass/língua: assoalho e língua, muc. jugal: mucosa jugal, pN: envolvimento linfonodal patológico, N+: houve envolvimento de linfonodo pela análise da peça cirúrgica (PC), N-: não houve esse envolvimento, pT: tamanho da neoplasia através análise da PC, agrupado em T1/T2 ou T3/T4, pTNM: estadiamento patológico pela análise da PC, agrupado em I/II ou III/IV, Dif. Hist.: diferenciação histológica, BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado, PD: pobremente diferenciado, Inv. PN: invasão perineural, Inv. VS: invasão vascular sanguínea e Inv. VL: invasão vascular linfática. Sim: houve, Não: não houve.

N.	Sexo	Idade	Álcool	Fumo	Raça	Tempo evolução	História familiar	Local	pN	pT	pTNM	Dif hist	Inv. PN	Inv. VS	Inv. VL	Óbito / Causa	Duração do Follow-up / Status
1	M	68	NI	sim	NI	NI	NI	assoalho	N+	T3/T4	III/IV	BD	não	não	não	sim / CA	13 meses/morto
2	M	67	NI	sim	NI	NI	NI	assoalho	N+	T3/T4	III/IV	MD	sim	sim	sim	sim / CA	11 meses/morto
3	M	62	sim	sim	NI	6 meses	sim	assoalho	N+	T3/T4	III/IV	MD	sim	não	sim	sim / CA	20 meses/morto
4	F	62	não	sim	NI	2 meses	sim	assoalho	N+	T1/T2	III/IV	BD	não	não	não	sim / CA	24 meses/morto
5	M	80	sim	sim	NI	NI	NI	língua	N+	T1/T2	III/IV	BD	não	não	não	sim / CM	36 meses/morto
6	M	57	sim	sim	B	6 meses	sim	gengiva	N+	T3/T4	III/IV	MD	sim	sim	sim	sim / CA	11 meses/morto
7	M	47	sim	sim	B	2 meses	sim	retromolar	N+	T1/T2	III/IV	BD	não	não	sim	não	18 meses/vivo
8	M	79	sim	sim	B	NI	não	assoalho	N+	T1/T2	III/IV	MD	sim	não	não	sim / CA	25 meses/morto
9	F	85	sim	sim	NI	4 meses	NI	gengiva	N+	T1/T2	III/IV	BD	sim	não	sim	sim / CA	11 meses/morto
10	M	55	sim	sim	NI	NI	NI	retromolar	N-	T1/T2	I/II	BD	sim	não	não	sim / CM	9 meses/morto
11	M	47	sim	sim	NI	3 meses	não	retromolar	N-	T3/T4	III/IV	BD	não	não	não	não	85 meses/vivo
12	M	53	sim	sim	NI	4 meses	não	retromolar	N-	T1/T2	I/II	PD	não	não	não	sim / CA	13 dias/morto
13	M	52	sim	sim	B	NI	NI	retromolar	N+	T1/T2	III/IV	BD	não	não	não	não	52 meses/vivo
14	F	90	não	não	B	NI	sim	muc.jug.	N-	T3/T4	III/IV	MD	sim	não	não	não	16 meses/vivo
15	M	51	sim	sim	B	NI	NI	assoalho	N+	T1/T2	III/IV	BD	não	não	não	não	21 meses/vivo
16	M	55	sim	sim	B	NI	sim	assoalho	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	23 meses/vivo
17	M	40	sim	sim	NI	6 meses	NI	assoalho	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	sim / CA	NI
18	F	76	não	não	A	NI	não	língua	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	48 meses/vivo
19	M	40	não	sim	NI	6 meses	não	gengiva	N+	T3/T4	III/IV	BD	sim	não	não	sim / CA	30 meses/morto
20	M	51	sim	sim	NI	NI	não	muc. jug.	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	87 meses/vivo
21	F	52	sim	sim	NI	NI	sim	língua	N+	T1/T2	III/IV	MD	não	sim	não	sim / CA	12 meses/morto
22	M	80	não	não	B	2 meses	não	gengiva	N-	T3/T4	III/IV	MD	não	não	não	sim / CA	5 meses/morto
23	M	56	sim	sim	NI	8 meses	não	assoalho	N+	T1/T2	III/IV	MD	sim	não	não	não	76 meses/vivo
24	M	50	sim	sim	B	NI	não	língua	N-	T1/T2	I/II	MD	não	não	não	não	18 meses/vivo
25	M	56	sim	sim	B	NI	sim	língua	N-	T3/T4	III/IV	MD	sim	não	não	sim / CA	13 meses/morto
26	M	63	sim	sim	NI	3 meses	não	língua	N-	T1/T2	I/II	MD	sim	não	não	sim / CA	6 meses/morto
27	F	53	sim	sim	B	NI	sim	língua	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	23 meses/vivo
28	M	68	NI	NI	B	NI	NI	língua	N+	T1/T2	III/IV	BD	sim	NI	não	não	24 meses/vivo
29	M	49	sim	sim	B	3 anos	NI	língua	N-	T1/T2	I/II	MD	sim	não	não	não	41 meses/vivo

30	M	60	sim	sim	B	1 ano	sim	língua	N+	T3/T4	III/IV	MD	sim	não	não	sim / CA	20 meses/morto
31	F	44	sim	sim	B	5 meses	sim	língua	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	47 meses/vivo
32	M	65	sim	sim	NI	1 ano	não	língua	N+	T1/T2	III/IV	MD	não	não	não	sim / CM	24 meses/morto
33	M	68	sim	sim	B	NI	sim	ass/líng	N+	T1/T2	III/IV	PD	sim	não	sim	não	31 meses/vivo
34	M	57	sim	sim	A	1 mês	não	língua	N+	T1/T2	III/IV	BD	sim	não	sim	não	32 meses/vivo
35	M	45	NI	sim	NI	4 meses	NI	palato	N+	T3/T4	III/IV	BD	sim	não	sim	sim / CA	5 meses/morto
36	M	52	sim	sim	NI	NI	não	palato	N+	T3/T4	III/IV	MD	não	não	sim	não	88 meses/vivo
37	M	59	sim	sim	NI	3 meses	sim	palato	N-	T1/T2	I/II	MD	não	não	não	sim / CA	1 mês/morto
38	M	63	sim	sim	B	3 meses	não	palato	N-	T3/T4	III/IV	MD	não	não	não	não	50 meses/vivo
39	M	54	sim	sim	B	5 meses	não	língua	N+	T1/T2	III/IV	MD	sim	não	não	não	86 meses/vivo
40	F	40	sim	sim	NI	NI	sim	língua	N+	T1/T2	III/IV	MD	sim	não	não	não	27 meses/vivo
41	M	61	não	não	B	3 meses	não	língua	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	31 meses/vivo
42	M	67	sim	sim	NI	2 meses	sim	língua	N-	T1/T2	I/II	BD	não	NI	NI	sim / CM	10 meses/morto
43	M	75	sim	sim	NI	2 meses	sim	língua	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	33 meses/vivo
44	M	54	sim	sim	NI	1 mês	sim	língua	N+	T3/T4	III/IV	BD	sim	sim	sim	sim / CA	1 mês/morto
45	M	64	sim	sim	NI	2 meses	sim	língua	N+	T1/T2	III/IV	BD	sim	não	não	sim / CM	16 dias/morto
46	M	52	sim	sim	B	4 meses	sim	assoalho	N-	T1/T2	I/II	BD	sim	não	não	não	25 meses/vivo
47	M	65	não	sim	NI	NI	não	assoalho	N-	T1/T2	I/II	BD	NI	NI	NI	não	20 meses/vivo
48	M	60	sim	sim	B	1 mês	não	assoalho	N-	T1/T2	I/II	BD	não	não	não	não	18 meses/vivo

ANEXO E - Amplificação das variantes do TGIF1 nas amostras de CEB

A tabela mostra os 48 casos analisados de CEB. N. Interno (FOUSP): número do caso no laboratório de Patologia Molecular da FOUSP. RGH (Hosp. Câncer): registro geral dos pacientes no Hospital do Câncer. Ratio 260/280: Pureza do RNA verificada por espectrofotômetro. Qualidade do RNA: considerada boa ou ótima, através de gel de integridade. +: sim houve amplificação. -: não houve amplificação. Os resultados de + e - são em relações aos transcritos do gene TGIF1 e as suas variantes transcripcionais analisadas, variante 1, variante 2, variante 3,4, variante 5, variante 7 e variante 8.

N.	N. Interno (FOUSP)	RGH (Hosp. Câncer)	Ratio 260/280	Qualidade do RNA	TGIF1	Variante 1	Variante 2	Variante 3,4	Variante 4	Variante 5	Variante 7	Variante 8
1	c.1	00.01757-4	1,800	Bom	+	-	+	+	+	+	+	-
2	c.4	03.02893-9	1,817	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	-
3	c.5	02.02450-0	1,800	Ótimo	+	-	-	+	-	+	+	-
4	c.6	04.01458-8	1,750	Ótimo	+	-	+	+	-	+	+	-
5	c.8	02.01088-7	1,827	Bom	+	-	+	+	-	+	+	-
6	c.12	06.02516-1	2,000	Bom	+	+	+	+	+	+	+	+
7	c.13	05.01697-5	1,802	Bom	+	+	+	+	-	+	+	-
8	c.15	93.02534-3	1,900	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	-
9	c.16	02.01379-7	1,986	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	-
10	c.19	00.03841-5	1,926	Bom	+	-	+	+	+	+	+	+
11	c.22	00.03977-2	1,829	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	-
12	c.23	00.04042-8	1,750	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
13	c.24	03.02923-9	1,900	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
14	c.25	86.04579-2	2,000	Ótimo	+	-	+	+	+	+	+	-
15	c.26	05.05026-0	1,900	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
16	c.27	05.04496-0	1,800	Bom	+	-	+	+	+	+	+	-
17	c.29	00.03594-7	1,772	Bom	+	-	+	+	+	+	+	-
18	c.30	03.03774-6	1,800	Bom	+	-	+	+	-	+	+	-
19	c.31	00.03835-0	1,800	Bom	+	-	+	-	-	-	+	-
20	c.32	00.03336-7	1,824	Bom	+	-	+	-	-	+	+	-
21	c.34	06.02092-5	1,864	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
22	c.35	05.05297-1	2,000	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
23	c.36	01.00833-1	1,981	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
24	c.38	06.01796-7	1,860	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+

25	c.40	05.04772-2	1,788	Bom	+	-	-	-	-	+	-	+
26	c.41	06.02197-2	1,900	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
27	c.43	05.04805-2	1,857	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	-
28	c.46	05.04641-6	1,975	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
29	c.47	04.00430-2	1,787	Bom	+	+	+	+	+	+	+	-
30	c.49	04.00554-6	1,817	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	+
31	c.50	03.05144-7	1,800	Bom	+	+	+	+	+	+	+	+
32	c.51	00.02788-0	1,971	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	+
33	c.53	05.00695-3	1,812	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
34	c.54	05.00276-1	1,820	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	+
35	c.55	01.00847-1	1,800	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
36	c.56	00.02529-1	1,949	Ótimo	+	-	+	+	+	+	-	+
37	c.57	02.03112-4	1,867	Bom	+	-	-	+	-	-	+	-
38	c.58	03.03727-4	2,000	Bom	+	+	+	+	+	+	+	-
39	c.1n	00.04043-6	1,800	Bom	+	+	+	+	+	+	-	-
40	c.2n	05.03001-3	1,810	Bom	+	+	+	+	+	+	-	+
41	c.3n	05.01188-4	1,756	Bom	+	+	+	+	+	+	+	+
42	c.5n	00.02868-1	1,821	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	-
43	c.6n	05.00555-8	1,800	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	-
44	c.7n	03.02979-4	1,810	Bom	+	+	-	+	+	+	-	-
45	c.10n	04.02918-6	1,740	Bom	+	+	+	+	+	+	+	-
46	c.13n	05.04184-8	1,839	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+
47	c.14n	06.01309-0	1,862	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	+
48	c.15n	06.01332-5	1,900	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+

ANEXO F - Amplificação das variantes do TGIF1 nos tecidos não tumorais (TN)

A tabela mostra os 12 casos analisados de TN. N. Interno (FOUSP): número do caso no laboratório de Patologia Molecular da FOUSP. RGH (Hosp. Câncer): registro geral dos pacientes no Hospital do Câncer. Ratio 260/280: Pureza do RNA verificada por espectrofotômetro. Qualidade do RNA: considerada boa ou ótima, através de gel de integridade. +: sim houve amplificação. -: não houve amplificação. Os resultados de + e - são em relações aos transcritos do gene TGIF1 e as suas variantes transcricionais analisadas, variante 1, variante 2, variante 3,4, variante 5, variante 7 e variante 8.

N.	N. Interno (FOUSP)	RGH (Hosp. Câncer)	Ratio 260/280	Qualidade do RNA	TGIF1	Variante 1	Variante 2	Variante 3,4	Variante 4	Variante 5	Variante 7	Variante 8
1	c.14	01.04237-8	1,788	Bom	+	-	+	+	+	+	+	-
2	c.17	02.01379-7	1,845	Ótimo	+	-	+	+	+	+	+	-
3	c.39	06.01796-7	2,000	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	-
4	c.44	04.01440-5	1,786	Bom	+	-	+	+	+	+	+	-
5	c.8n	03.02979-4	1,777	Bom	+	+	-	+	+	+	-	-
6	c.11n	05.04772-2	1,748	Bom	+	+	+	+	+	+	+	-
7	1N	06.05136-7	1,808	Bom	+	+	+	+	+	+	+	+
8	2N	03.03248-5	1,750	Bom	+	+	+	+	+	+	+	+
9	5N	03.04789-0	1,807	Bom	+	+	+	+	+	+	+	-
10	11N	02.00175-6	1,700	Ótimo	+	+	+	+	+	+	-	-
11	14N	01.00698-3	1,810	Bom	+	+	+	+	+	+	-	-
12	15N	95.03581-8	1,700	Ótimo	+	+	+	+	+	+	+	+

ANEXO G – Iniciadores das variantes do TGIF1

Iniciadores das variantes 3,4**Variante 3: NM_173208**

(Primer amplifica variante 3 e 4)

Iniciadores da variante 4**Variante 4: NM_003244** Iniciadores da variante 5**Variante 5: NM_173209**

Iniciadores da variante 7

Variante 7: NM_173211

F: 5' accctccccacgcgcacatt 3' (55-74)

R: 5' tgccatcacggactccaca 3' (433-452)

Iniciadores da variante 8

Variante 8: NM_174886

F: 5' gcgcaggagccagagact 3' (42-61)

R: 5' gccatcccgaagaatctgc 3' (379-398)

ANEXO H - Dados clínicos, histológicos e imunoistoquímicos

A tabela mostra os 46 casos selecionados para imunoistoquímica. N.: número, AP FOUSP: número do caso pelo exame anátomo- patológico. NI: não informado. Sexo: M, masculino, F, feminino. Raça: B, branca, N, negra, A, amarela, O, outras. Graduação: os casos foram graduados em 0, I, II e III, conforme a porcentagem de celular marcadas. Núcleo e citoplasma: +: houve marcação, -: não houve marcação.

N.	AP FOUP	Local	Idade	Sexo	Raça	Imunoistoquímica			Diferenciação Histológica
						Graduação	Núcleo	Citoplasma	
1	1- 55495	Assoalho	NI	M	B	II	+	+	Pobrememente Diferenciado (n=21)
2	2- 43898	Assoalho	60	M	B	II	+	+	
3	3- 44079	Assoalho/Língua	44	M	B	II	+	+	
4	4- 44489	Assoalho	50	M	B	III	+	+	
5	5- 50574	Assoalho/Língua	54	M	B	III	+	+	
6	6- 40578	Assoalho/Língua	55	M	B	III	+	-	
7	7- 50831	Língua	54	M	B	III	+	+	
8	8- 39305	Assoalho	47	M	B	III	+	+	
9	9- 19851	Assoalho	53	F	B	I	+	-	
10	10- 29842	Assoalho	50	M	N	III	+	-	
11	11- 51267	Assoalho	68	M	B	II	-	+	
12	12- 52948	Assoalho	52	M	B	III	+	+	
13	13- 56098	Assoalho	56	M	B	III	+	+	
14	14- 52865	Língua	80	M	B	III	+	+	
15	15- 55756	Assoalho	64	M	B	III	+	+	
16	16- 56163	Assoalho	49	M	B	II	+	+	
17	17- 56129	Assoalho	44	M	O	III	+	+	
18	18- 55890	Assoalho	75	M	N	III	+	+	
19	19- 56408	Assoalho	60	M	B	III	+	+	
20	20- 56652	Língua	72	M	B	III	+	+	
21	21- 57269	Assoalho	56	M	B	III	+	+	
22	22- 17257	Assoalho	50	M	N	II	+	+	Moderadamente Diferenciado
23	23- 39374	Assoalho/Língua	44	M	B	II	+	+	
24	24- 51639	Assoalho	69	M	B	II	-	+	

25	25- 42191	Assoalho	55	M	B	III	+	+	Moderadamente Diferenciado (n=12)
26	26 - 50105	Assoalho	52	M	O	I	-	+	
27	27- 20946	Assoalho	70	M	B	III	+	-	
28	28- 44178	Assoalho	57	M	B	0			
29	29- 34202	Língua	65	M	B	III	+	+	
30	30- 56018	Língua	79	M	N	II	+	-	
31	31- 56895	Assoalho	NI	M	B	III	+	+	
32	32- 57796	Língua	65	M	B	III	+	+	
33	33- 58127	Assoalho	47	M	N	III	+	-	
34	34- 13022	Assoalho	74	F	B	III	+	-	Bem Diferenciado (n=13)
35	35- 17835	Assoalho	42	M	B	I	+	+	
36	36- 54435	Língua	61	M	B	II	+	-	
37	37- 48305	Assoalho	65	F	A	II	+	-	
38	38- 56996	Língua	40	M	B	III	+	-	
39	39- 57236	Língua	69	F	B	III	+	-	
40	40- 55678	Língua	83	M	B	III	+	-	
41	41- 46701	Língua	80	F	B	III	+	+	
42	42- 26524	Assoalho	39	M	B	II	+	+	
43	43- 41722	Assoalho	55	M	B	II	+	+	
44	44- 42817	Assoalho	45	F	B	I	+	+	
45	45-56012	Língua	50	F	B	II	+	-	
46	46- 56775	Assoalho/Língua	62	M	B	III	+	+	