MÁRCIA SAMPAIO CAMPOS

**EXPRESSÃO DE GENES HOMEBOX EM CÉLULAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA ESTIMULADAS COM
EGF E TGF- β**

São Paulo

2007

Márcia Sampaio Campos

**Expressão de genes homeobox em células de carcinoma
epidermóide de boca estimuladas com EGF e TGF- β**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2007

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

Campos, Márcia Sampaio

Expressão de genes homeobox em células de carcinoma epidermóide de boca estimuladas com EGF e TGF- β / Márcia Sampaio Campos; orientador Fabio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2007.

114p. : fig., tab.; 30 cm.

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

1. Cultura de células – Carcinoma de células escamosas 2. Genes Homeobox 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 COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Campos MS. Expressão dos genes homeobox em células de carcinoma epidermóide de boca estimuladas com EGF e TGF- β [Tese de Doutorado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, _____ / _____ / 2007.

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Bruno das Neves Cavalcanti, SEMPRE presente nos momentos mais importantes de minha vida, compartilhando experiências, amor e paciência. Você me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

A meus pais, Márcio e Graça, pelo apoio, amor e por me fornecerem a base, o alicerce da vida... minha família. Obrigada por moldarem o ser que hoje sou.

Às minhas irmãs Christiane, Patrícia e Luciana, mais do que irmãs, AMIGAS de todas as horas, minha sincera declaração de amor e admiração.

À minha “nova família” Dinarte, Neide, Samuel e Daniela por serem grandes incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional.

A toda minha família e amigos que acompanharam e torceram por minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, que tudo pode e tudo faz, por guiar meus passos até aqui me ajudando a ultrapassar todas as barreiras e por colocar em meu caminho “sinais do sEu amor” em forma das pessoas que fizeram parte e contribuíram para essa realização.

À Bruno das Neves Cavalcanti, a quem não só dedico esse trabalho como também agradeço pelo apoio e colaboração em todas as fases do mesmo.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, mais que um orientador UM GRANDE AMIGO, exemplo de pessoa e de profissional, por ter depositado tanta confiança em mim e por ter me proporcionado um rico crescimento ao longo desses anos. Você foi educador, amigo, e um exemplo ao qual pretendo sempre me espelhar.

À Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, pela amizade e pelo espírito inquieto e questionador que mais do que informar, forma todos os que a rodeiam. Obrigada por todo o apoio e conselho e pela inspiração. Aprendi muito com você.

À Alexandra Fontes da Costa, sempre pronta a me ouvir e a compartilhar comigo todos os momentos... você nem imagina o quanto sua presença foi importante nessa fase da minha vida. Sempre ao meu lado, você contribuiu com sua amizade a qual pretendo contar para sempre.

À Camila de Oliveira Rodini pela amizade que desde o início, tornou os dias no laboratório mais alegres. Passamos tanto tempo juntas que já viramos a “Márcia-Camila”. Obrigada por todo o apoio, pelo ombro amigo e pelos momentos compartilhados.

À Simone Bandeira, minha irmãzinha de sempre, por também estar presente nesse momento e por ser “meu braço direito”. Poder contar com a sua amizade há longos anos é muito bom.

Aos amigos que se tornaram “especialmente especiais” ao longo dessa jornada... Fabio Coracin, Felipe Salles, Filipe Modolo, Flávia Caló, Juliana Kawamura, Katiucia Paiva, Katiuchia Uzun Sales, Luciana Marocchio, Lineu Perroni Jr, Michelly Marin Peruzetto, Patrícia Adachi, Rodrigo Elias (Buco) e Sergio de Melo Júnior.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, através de sua Diretoria, funcionários e docentes que deram condições para a conclusão desta importante etapa.

À Profa. Dra. Suzana COM de Sousa que de maneira tão especial trata com igualdade e com doçura a todos. Obrigada por todo o carinho e pelos valiosos ensinamentos.

À Profa. Dra Marina Magalhães que com seu espírito de liderança inspira, agrega e cativa a todos. Obrigada pela confiança e carinho sempre demonstrados.

Ao Prof. Dr.Décio dos Santos Pinto Jr, pelo auxílio durante a realização do trabalho, e também pela amizade e apoio sempre demonstrados.

Às Profas. Dras Andréa Mantesso e Karem Lopes Ortega pela amizade e confiança sempre demonstradas. Sentirei muitas saudades.

Aos demais amigos de pós graduação, Adriano, Alexandre Borges, Alexandre Fraige, Aluana, Arlindo Aburad, Aline, Brunno, Camila Fragata, Carol Capuano, Cury, Fabiana, Fernanda Giudice, Fernanda Yamamoto, Juliana, Karen Renata, Luciana Matizonkas, Márcio, Nathalie, Paulo Braz, Paulo dos Santos, Renata Acay, Roberto Rejas, Tatiana Libório e Thaís Acquafreda pela rica convivência que me fez crescer em vários aspectos.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal: Bia, Débora, Elisa, Nair, Néia, Patrícia, Sandra (Cape), Zilda e a nossa querida e saudosa Edna que fizeram os dias em minha “segunda casa” – o laboratório – inesquecíveis. Sentirei muitas saudades de TODAS vocês.

A todos aqueles que estiveram presentes na realização da pós-graduação e de alguma forma contribuíram para meu crescimento.

À bibliotecária Gláucia pela simpatia e disponibilidade nas angustiantes “horas finais” da entrega da Tese.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido, imprescindível à realização do presente trabalho.

À Comissão Nacional de Pesquisa (CNPq) pelos recursos oferecidos ao Laboratório de Patologia Molecular, onde esse estudo foi desenvolvido.

Campos MS. Expressão de genes homeobox em células de carcinoma epidermóide de boca estimuladas com EGF e TGF- β [Tese de Doutorado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Genes homeobox, vitais para muitos aspectos relacionados com crescimento e diferenciação celular, têm sido descritos desregulados em alguns cânceres. Seu papel na carcinogênese, principalmente de carcinomas epidermóides de boca permanece pouco claro e pobremente caracterizado. Desse modo, esse estudo objetivou avaliar, em cultura de células, o perfil de expressão de seis genes homeobox (ASH2L, HOXA7, HHEX, PKNOX1, PITX1, TGIF) selecionados dentre aqueles previamente identificados no Projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço (2001) sob estímulo de EGF e TGF- β 1. Para tal, linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço primário (HN6) e metastático (HN31) e uma linhagem não-tumoral (HaCat) foram cultivadas sob condições-padrão. Após a confecção do cDNAs de cada linhagem, por meio de RT-PCR, os transcritos foram amplificados e quantificados pela técnica de PCR em tempo real. Os dados foram normalizados com o gene HPRT e a quantificação relativa foi realizada seguindo o método do Δ Ct. De acordo com os resultados foi possível verificar que o EGF produziu uma modulação variável da expressão dos genes avaliados em todas as linhagens celulares, enquanto que, em geral, o TGF- β 1 foi capaz de aumentar significativamente (ANOVA, $p < 0,05$) a expressão dos transcritos de 5 genes homeobox (HOXA7, HHEX, PKNOX1, PITX1, TGIF). Particularmente transcritos dos

genes PITX1 e TGIF foram significativamente mais expressos nas linhagens tumorais (HN6 e HN31) frente à linhagem não-tumoral quando tratados com TGF- β 1. Desse modo, sugere-se que os genes homeobox estudados desempenhem diferentes funções na carcinoma epidermóide de boca, e que, especialmente PITX1 e TGIF atuem como oncogenes inibindo a resposta anti-proliferativa dependente de TGF- β e levando a progressão tumoral.

Palavras-Chave: Genes Homeobox; Carcinoma epidermóide de boca; Linhagens celulares; PCR quantitativo; EGF; TGF- β

Campos MS. Expression of homeobox genes in oral squamous cell carcinoma cell lines, stimulated with EGF and TGF- β [Tese de Doutorado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Homeobox genes, vital to many aspects related with cellular growth and differentiation, had been described as deregulated in some cancers. Their role in carcinogenesis, mainly oral squamous cell carcinomas, remains unclear and poorly characterized. Thus, this study had the purpose to evaluate, in cell cultures, the expression profile of six homeobox genes (ASH2L, HOXA7, HHEX, PKNOX1, PITX1, TGIF) selected among genes previously identified in the Head and Neck Cancer Genoma Project (2001), under stimulation with EGF and TGF- β 1. Oral squamous cell carcinoma cell lines from primary tumour (HN6) and from methastasis (HN31), and a non-tumoral cell line (HaCat) were cultured under standard procedures. CDNAs were obtained by RT-PCR and the transcripts were amplified and quantified by real-time PCR. Data were normalized by HPRT gene and the relative quantification was made by the Δ Ct method. According to the results, it was possible to observe that EGF produced a variable modulation of the analyzed genes, in all cell lines. Generally, TGF- β 1 was able to significantly increase (ANOVA, $p < 0,05$) the expression of the transcripts of 5 homeobox genes (HOXA7, HHEX, PKNOX1, PITX1, TGIF). Transcripts of PITX1 and TGIF genes were particularly more expressed in the tumoral cell lines (HN6 e HN31), when compared to the non-tumoral cell line, when treated with TGF- β 1. It is suggested that the studied homeobox genes play different

roles in oral squamous cell carcinoma and that, especially the PITX1 and TGIF act as oncogenes, inhibiting the TGF-dependent anti-proliferative response, leading to tumour progression.

Keywords: Homeobox genes; Oral squamous cell carcinoma; Cell lines; qPCR; ; EGF; TGF- β

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Esquema ilustrativo dos genes Hox da <i>Drosophila</i> (HOM-C), alinhados com os seus homólogos em humanos (HOX A, B, C e D) e suas respectivas posições cromossômicas (GRIER et al., 2005)	30
Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da via de sinalização do EGF (Retirado de: www.biocarta.com/pathfiles/egfPathway.gif).....	47
Figura 2.3 - Esquema ilustrativo da via de sinalização do TGF- β (Retirado de: www.biocarta.com/pathfiles/tgfbPathway.gif).....	52
Figura 4.1 - Esquema ilustrativo dos grupos Controle e Experimental.....	57
Figura 4.2 - Esquema ilustrativo da extração de RNA pelo método TRizol (Invitrogen) e de gel de integridade para verificação da qualidade do RNA obtido...	59
Figura 5.1 - Gráfico da curva de crescimento das células sem tratamento.....	67
Figura 5.2 - Gráfico da curva de crescimento das células tratadas com EGF e TGF- β 1. Os dados foram normalizados com a curva de crescimento das células sem tratamento que foram consideradas 100% (representadas pela linha preta)	67
Figura 5.3 - Gel de agarose 2%, exemplificando a amplificação por PCR convencional dos 4 genes constitutivos nas linhagens estudadas. Onde A= β -actina; B= GAPDH; C= HPRT; D= Tubulina	68
Figura 5.4 - Gel de agarose 2%, exemplificando a análise semi-quantitativa realizada com o programa AlphaDigDoc. Onde 1= 60ng; 2= 40ng; 3= 20ng	68
Figura 5.5 - Gráfico evidenciando a variação dos 4 genes constitutivos analisados.	69
Figura 5.6 - Gráfico representando a expressão do gene constitutivo β -actina nas 3 linhagens tratadas e não tratadas.....	70

Figura 5.7 - Gráfico representando a expressão do gene constitutivo GAPDH nas 3 linhagens tratadas e não tratadas.....	70
Figura 5.8 - Gráfico representando a expressão do gene constitutivo HPRT nas 3 linhagens tratadas e não tratadas.....	71
Figura 5.9 - Gráfico representando a expressão do gene constitutivo Tubulina nas 3 linhagens tratadas e não tratadas.....	71
Figura 5.10 Gel de agarose 2%, exemplificando a amplificação por PCR convencional dos 6 genes homeobox nas linhagens estudadas. Onde, Std= Padrão molecular; A= ASH2L; B= HHEX; C= HOXA7; D= PITX1; E= PKNOX1; F= TGIF	72
Figura 5.11 Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene ASH2L nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1	73
Figura 5.12 Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene HHEX nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento em cada linhagem celular (Letras minúsculas = HN6; Letras maiúsculas = HN31).	74
Figura 5.13 Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene HOXA7 nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tipo celular em cada tratamento (Letras minúsculas = Controle; Letras maiúsculas = TGF- β 1)	75
Figura 5.14 Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene PKNOX1 nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento na linhagem HN6.....	76
Figura 5.15 Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene TGIF nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento na linhagem HN6. O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tipo celular no tratamento com TGF- β 1	77

Figura 5.16 Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene PITX nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento em cada linhagem celular (Letras minúsculas = HN6; Letras maiúsculas = HN31; Letras gregas = HaCat). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tipo celular no tratamento com TGF- β 1 78

Figura 6.1 Esquema ilustrando a hipótese da interação do TGIF com a via de sinalização do TGF- β 1 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sequência dos iniciadores utilizados para as reações de PCR convencional em relação ao gene, ao número de acesso no Gene Bank, ao sentido e ao tamanho do produto.....	61
Tabela 4.2 - Reagentes utilizados nas reações de PCR convencional.	62
Tabela 4.3 - Condições de ciclagem das reações de PCR convencional, de acordo com o gene, a temperatura e o tempo otimizados.....	62
Tabela 4.4 - Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR quantitativo em relação ao gene, ao número de acesso no Gene Bank, ao sentido e ao tamanho do produto.	64

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Carcinoma epidermóide de boca	21
2.2 Genes homeobox e a carcinogênese	24
2.3 Genes Homeobox Agrupados HOX	29
2.3.1 HOXA7	31
2.4 Genes Homeobox não agrupados	32
2.4.1 ASH2L	33
2.4.2 HHEX	34
2.4.3 PITX1	36
2.4.3 PKNOX1	38
2.4.3 TGIF	40
2.5 Genes homeobox e os fatores de crescimento e diferenciação celular.....	42
2.5.1 EGF (Fator de crescimento epitelial)	43
2.5.2 TGF- β 1 (Fator de crescimento transformante)	47
3 PROPOSIÇÃO	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5 RESULTADOS	66
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS.....	108

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é uma lesão agressiva que corresponde a cerca de 90 a 95 % das neoplasias malignas de cabeça e pescoço e compromete a qualidade de vida dos pacientes acometidos além de apresentar alto índice de mortalidade (SLOOTWEG; EVESON, 2005; MASSANO et al., 2006). Esses fatores aliados a ausência de marcadores diagnósticos e prognósticos para essa neoplasia (CHIESA et al., 1999; HELLIWELL, 2001; QUON; LIU; CUMMINGS, 2001; LOPES et al., 2002), têm levado à busca da identificação de genes e proteínas específicas bem como de sua sequência de aparecimento durante a transformação de células normais em células malignas (REGEZI; JORDAN, 2001). Acredita-se que esse seja um importante fator para o estabelecimento de novas e específicas estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias.

Recentemente, tem se acreditado que muitos dos caminhos moleculares que determinam a carcinogênese representam aberrações de processos normais que controlam a embriogênese uma vez que ambos os eventos compartilham diversos processos tais como proliferação e diferenciação (KELLEHER et al., 2006). Nesse contexto, os genes homeobox emergem como clássicos representantes do íntimo relacionamento entre embriogênese e neoplasia (SAMUEL; NAORA, 2005). Os homeobox compreendem uma família de genes reguladores do desenvolvimento, vitais para o crescimento e a diferenciação de diversos tecidos, incluindo tecidos orofaciais. Eles codificam proteínas que funcionam como fatores de transcrição e regulam vários aspectos da morfogênese e diferenciação celular (ABATE-SHEN, 2002; NUNES et al., 2003). Atualmente, essa família de genes têm sido associada a

diferentes cânceres humanos (CILLO et al., 1992; DE VITA et al., 1993) tais como leucemias (LAWRENCE; LARGMAN, 1992; MAGLI et al., 1991; PETRINI et al., 1992), câncer de cólon (DE VITA et al., 1993), câncer de esôfago (CHEN et al. 2005) entre outros. Porém, em cânceres de boca sua abordagem ainda é modesta (ZHU et al., 2004; HASSAN et al., 2006).

Adicionalmente, a participação das vias de sinalização do EGF (fator de crescimento epitelial) e do TGF- β (fator de crescimento transformante) em diferentes tumores tem sido muito estudada uma vez que elas parecem estar associadas com supressão e progressão tumoral (LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001; BIERIE; MOSES, 2006; YEUDALL et al., 2005). A recente literatura enfatiza que a complexa natureza desses dois fatores apresenta uma oportunidade ao desenvolvimento de estratégias de intervenções terapêuticas para cânceres-alvo (BIERIE; MOSES, 2006; NYATI et al., 2006). Nesse contexto, o conhecimento de novos genes relacionados com a carcinogênese, e de suas interações com as vias de sinalização do EGF e do TGF- β , pode promover importantes informações ao futuro estabelecimento de estratégias mais específicas contra o surgimento e a progressão do CEB.

Com esse objetivo, o Laboratório de Patologia Molecular da Universidade de São Paulo tem se dedicado ao estudo dos genes homeobox no CEB (CAZAL, 2004; LIBÓRIO, 2004; MATIZONKAS-ANTONIO, 2005), visando avaliar sua real participação nessa neoplasia para melhor compreender sua expressão e seus mecanismos de regulação. Só assim, esses genes poderão ser considerados potenciais marcadores de comportamento clínico, ou como alvos para terapias.

Desse modo, é objetivo do presente estudo avaliar, em cultura de células de CEBs sob a influência de EGF e TGF- β , o perfil de expressão de 6 genes homeobox

selecionados dentre aqueles previamente identificados no Projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço (2001), visando contribuir ao entendimento do papel dos homeobox na carcinogênese e sua interação com essas vias de sinalização.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

Dados evidenciam que, no Brasil, são registrados sete mil novos casos de câncer bucal a cada ano, e destes, cerca de 95% são representados pelo carcinoma epidermóide (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992). Segundo dados do INCA (2007), a estimativa da incidência de câncer de boca no Brasil para 2006 mostra que esta neoplasia apresentará 10.060 casos entre homens e 3.410 entre as mulheres.

Dentre os cânceres que acometem a boca, o carcinoma epidermóide bucal (CEB) é o mais comum, respondendo por cerca de 90 a 95 % das neoplasias malignas nessa região (SLOOTWEG; EVESON, 2005). O CEB apresenta forma clínica variada e predileção por indivíduos do sexo masculino com mais de 50 anos, leucodermas e usuários de tabaco e álcool (BOYLE et al., 1990; SLOOTWEG; EVESON, 2005). Porém recentemente, esse perfil tem sido modificado uma vez que relatos de CEB em pacientes jovens são cada vez mais frequentes (LLEWELLYN et al., 2003). Clinicamente, o CEB pode se manifestar como uma lesão ulcerada, persistente, com bordas elevadas e endurecidas, fundo necrótico, coloração vermelho intensa, entremeada por placas amareladas, base infiltrativa e sangrante. Os principais locais de incidência no interior da cavidade bucal são a superfície póstero-lateral e ventral da língua e assoalho de boca seguida de palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (NEVILLE et al., 2002; SLOOTWEG; EVESON, 2005). Na região perioral acomete com maior frequência o

lábio inferior devido à exposição à luz ultravioleta. Em relação aos sintomas, a maioria deles é observada em estágios mais avançados da doença o que aumenta a taxa de morbidade e mortalidade e reforça a importância do diagnóstico precoce (SLOOTWEG; EVESON, 2005).

Apresentando uma etiologia bastante variada, o desenvolvimento do carcinoma epidermóide parece estar relacionado a um processo de várias etapas, onde fatores externos e alterações genéticas podem estar envolvidos (LEETHANAKUL et al., 2000; MASSANO et al., 2006), bem como fatores de risco como hábitos nocivos de tabagismo e etilismo (JORDAN; DALEY, 1997; VOKES et al., 1993; MASSANO et al., 2006) e, mais recentemente descrito, o envolvimento do HPV (papilomavírus humano) (HERRERO et al., 2003).

Para seu diagnóstico precoce é necessária a periódica inspeção visual e a palpação dos sítios mais comumente envolvidos e dos linfonodos cervicais, sendo que a confirmação da lesão se dá por biópsia seguida do exame histopatológico (SLOOTWEG; EVESON, 2005). Dentre as características histopatológicas mais comuns do CEB ressalta-se a perda de definição da interface do epitélio de revestimento da mucosa com o tecido conjuntivo subjacente, e a desorganização da arquitetura de suas camadas celulares, particularmente representada pela substituição das células da camada basal por células irregulares e de tamanho aumentado. Adicionalmente, um número variável de figuras de atipia e de mitoses é frequentemente observado (SLOOTWEG; EVESON, 2005).

Seu prognóstico depende de vários fatores, entre eles o tamanho do tumor e o envolvimento nodal (PLATZ; FRIES; HUDEC, 1985). Além deles, a graduação histológica, a observação das margens do tumor e a invasão vascular, são importantes fatores relacionados ao estabelecimento do prognóstico do CEB

(SLOOTWEG; EVESON, 2005). Embora de importância reconhecida, esses fatores não permitem realmente prever o comportamento e o prognóstico dos casos, e reverter de forma significativa a história natural dessa doença. Nesse contexto, marcadores moleculares têm sido extensamente procurados e estudados, porém, ainda não identificados (CHIESA et al., 1999; HELLIWELL, 2001; QUON; LIU; CUMMINGS, 2001; LOPES et al., 2002).

O tratamento do CEB inclui a associação ou não de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Em lesões iniciais e restritas ao local de origem, pode-se optar pela cirurgia ou pela radioterapia; já a quimioterapia pode ser empregada em casos mais avançados visando a redução do tumor e possibilitando o tratamento posterior por radioterapia ou cirurgia, porém o prognóstico nesses casos é ruim (NEVILLE, 2002; SAPP; EVERSOLE, 2003).

Recentemente, estudos têm realçado a importância da participação de oncogenes, de genes supressores e de genes responsáveis pelo reparo do DNA no processo de carcinogênese. Estes genes, quando alterados, acarretam uma desregulação nas funções básicas da célula como divisão, diferenciação, senescência e apoptose, atribuindo à neoplasia suas características (JORDAN; DALEY, 1997; TODD; DONOFF; WONG, 1997). Nesse sentido, o envolvimento de vários genes vêm sendo discutido nos carcinomas epidermóides de boca (CEBs), como por exemplo os genes p53 (ROWLEY et al., 1998) e o APC - *adenomatous polyposis coli* (LARGEY; MERLEY; SAUK, 1994) e, mais recentemente os genes homeobox (HASSAN et al., 2006).

2.2 Genes homeobox e a carcinogênese

Atualmente, a carcinogênese é entendida como resultado do acúmulo de alterações no genoma da célula, e geram características fenotípicas particulares culminando na manifestação completa do fenótipo neoplásico. Essas alterações genéticas influenciam sinalizações celulares que envolvem crescimento e diferenciação e são encontradas em várias neoplasias diferentes, porém, algumas alterações podem ser especificamente relacionadas a determinadas neoplasias fazendo com que tecidos neoplásicos histologicamente indistinguíveis apresentem diferentes alterações moleculares que auxiliem em seu diagnóstico (SABBAGA, 2000). Em carcinomas epidermóides de boca, alterações genéticas podem ocorrer em diferentes tempos do processo da carcinogênese, na forma de mutações variando entre deleções, alterações no padrão de expressão, ampliações e/ou translocações (PARTRIDGE et al., 1989). As alterações gênicas ocorrem, normalmente, em dois tipos de genes reguladores da proliferação e da diferenciação celular: respectivamente os protooncogenes e os genes supressores de tumor (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). Quando alterados, os protooncogenes passam a ser chamados oncogenes, e, podem levar as células à proliferação descontrolada com capacidade de invasão. Assim, os oncogenes podem ser definidos como genes nos quais alterações genéticas causam o efeito de ganho adicional de função que contribui ao fenótipo maligno e ao desenvolvimento do câncer. Essas alterações podem ser observadas por meio da expressão elevada de determinado gene bem como da proteína por ele codificada. Já as alterações nos genes supressores de tumor levam à inativação de suas propriedades inibitórias, ou

seja, a perda de sua função resulta na promoção de malignidade. Os supressores de tumor são usualmente genes reguladores do crescimento ou de outras funções cujo efeito pode afetar a invasividade e o potencial metastático. Essa perda de função dos genes supressores de tumor pode comumente ocorrer por meio de mutações ou pelo conhecido fenômeno epigenético denominado metilação (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004).

Estudos relacionados a diferentes genes envolvidos na carcinogênese vêm sendo freqüentemente desenvolvidos. Um exemplo são as investigações relacionadas aos genes homeobox, importantes no controle e desenvolvimento embrionário, e que atuam no topo de hierarquias genéticas regulando aspectos de morfogênese e diferenciação. Os homeobox compreendem uma família de genes reguladores do desenvolvimento, vitais para o crescimento e a diferenciação de diversos tecidos, incluindo tecidos orofaciais (ABATE-SHEN, 2002; NUNES et al., 2003). Primeiramente identificados na mosca *Drosophila melanogaster* são hoje também encontrados em todas as espécies eucarióticas (STEIN et al., 1996), sendo classificados como reguladores globais do desenvolvimento embrionário. São representados por diversas classes de genes, atuando em diferentes estágios do desenvolvimento e sendo expressos, geralmente, em células indiferenciadas ou proliferativas (ABATE-SHEN, 2002).

O termo homeobox, surgiu da terminologia genética “mutação homeótica” que se relaciona ao fenômeno da homeose ou conversão de um seguimento corporal em outro membro, descrito na mosca *Drosophila* (BRIDGE; MORGAN, 1923). Esses genes possuem um segmento de DNA característico (o chamado homeobox) constituído de 183 pares de base que codifica uma proteína com 61 aminoácidos, denominada homeodomínio. Este domínio tem a função de fator de transcrição,

interagindo com genes alvos e promovendo sua modulação, seja por ativação ou por repressão, na dependência do sinal recebido pela célula (NUNES et al., 2003).

Estruturalmente, o homeodomínio consiste num motivo hélice-alça-hélice que se liga ao DNA por meio da inserção da hélice de reconhecimento no sulco maior do DNA e do seu braço N-terminal no sulco menor (GEHRING et al., 1990). O braço N-terminal modula a afinidade de ligação das proteínas homeobox, contribuindo para interações seletivas e altamente específicas com diferentes alvos (PELLEGRIN et al., 1994), permitindo assim que as homeoproteínas ativem ou reprimam a expressão de genes-alvos tais como fatores de crescimento (FORD, 1998; CILLO et al., 1999). Em tecidos normais, as atividades cumulativas dos genes homeobox modulam a proliferação e a diferenciação, sendo que, perturbações na expressão desses genes parecem promover o fenótipo transformado (ABATE-SHEN, 2002). Os genes homeobox são expressos durante a embriogênese em padrões que refletem suas funções biológicas e suas informações posicionais específicas (BONCINELLI; MALLAMACI; LAVORGNA, 1994; BONCINELLI MACONOCHE et al., 1996). Baseados em sua significância para o desenvolvimento e a diferenciação, e sua frequente desregulação no câncer, os genes homeobox são exemplos importantes da relação entre oncogênese e embriogênese.

Embora sua expressão desregulada tenha sido originalmente relacionada às atividades oncogênicas, os genes homeobox não devem ser considerados como oncogenes “clássicos” ou supressores de tumor devido às características únicas relacionadas a sua expressão e função, como alterações tecido-específicas e desregulação não relacionada à mutações. Esses fatos levaram Abate-Shen (2002) a defini-los como “moduladores de tumor” positivos ou negativos. Expressos em carcinomas e nos tecidos embrionários correspondentes, dos quais as células

tumorais são derivadas (CILLO et al., 1992; CILLO et al., 2001), os genes homeobox que são super-regulados em carcinomas apresentam padrões de expressão restritos às células indiferenciadas ou proliferativas, enquanto que, aqueles pouco regulados em carcinomas são normalmente expressos em tecidos diferenciados (ABATE-SHEN, 2002).

Atualmente, há um número crescente de trabalhos associando genes importantes para o desenvolvimento embrionário 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 (ABATE-SHEN, 2002). Nesse aspecto, os genes homeobox estão sendo associados a diversos cânceres humanos por se mostrarem desregulados em alguns deles. Porém, embora seja relatado um importante envolvimento dos genes homeobox em células normais e neoplásicas (LAWRENCE; LARGMAN, 1992; PETRINI et al., 1992; GIAMPAOLO et al., 1994; SAUVAGEAU et al., 1994) e estudos revelem sua associação com vários cânceres humanos como leucemias (LAWRENCE; LARGMAN, 1992; MAGLI et al., 1991; PETRINI et al., 1992), linfomas (BIJL et al., 1997), câncer de cólon (DE VITA et al., 1993; CILLO et al., 1999), câncer de fígado e pulmão (CILLO et al., 1999), até o momento existem somente dois relatos na literatura sobre o envolvimento dos genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca (CEB).

Zhu et al. (2004), verificaram a expressão do gene homeobox Quox-1 em CEB e em epitélios atípicos frente a epitélios não-tumorais. Nesse estudo, através da observação da presença desse gene homeobox em carcinomas e em tecidos displásicos, os autores sugeriram que os genes homeobox podem funcionar como marcadores biológicos de malignidade e de proliferação do CE de boca. Finalmente,

Hassan et al. (2006), estudaram os 39 genes homeobox agrupados (HOX) em mucosa normal, displasias e CEBs e encontraram a relação de 18 deles com essa neoplasia. Especificamente, os autores observaram que oito genes HOX estavam presentes somente na neoplasia (HOXA10, HOXA13, HOXB7, HOXC4, HOXC8, HOXD9, HOXD10, HOXD13) e cinco estavam expressos tanto em CE quanto em tecido não tumoral (HOXA7, HOXA9, HOXC6, HOXA2, HOXC9), sendo que três deles apresentaram expressão muito superior na neoplasia maligna (HOXA7, HOXA9, HOXC6). Acredita-se que os cinco genes expressos em ambos os tecidos tenham a função de manter a estrutura normal da mucosa esofágica, enquanto os oito que estão presentes apenas no CE, acrescidos dos outros três que possuem expressão superior na neoplasia maligna, estejam envolvidos no processo de carcinogênese.

De maneira geral, as consequências dos genes homeobox para o processo de carcinogênese podem ser interpretadas como uma extensão de sua função normal (ABATE-SHEN, 2002). Ainda assim, uma vez que os modos moleculares e celulares de ação dos homeobox ainda não são completamente entendidos no câncer bucal, torna-se importante o estudo dessa família de genes para o estabelecimento de sua possível participação em específicos fenótipos de cânceres.

A seguir, uma breve descrição dos genes homeobox estudados no presente trabalho será realizada de modo a permitir maior conhecimento a cerca dos mesmos. Vale ressaltar que esses genes foram selecionados com base no primeiro projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço realizado pelo Instituto Ludwig de São Paulo (2001) no qual tiveram sua expressão observada.

2.3 Genes Homeobox Agrupados HOX

Os genes HOX são caracterizados pela homologia estrutural e funcional com os genes homeóticos da *Drosophila melanogaster*. No genoma humano, os homeobox agrupados estão organizados em grupos denominados A, B, C e D, e mapeados, respectivamente, nos cromossomos 7, 17, 12 e 2 (SCOTT, 1992), de acordo com o grau de similaridade entre seus respectivos homeodomínios, totalizando 39 membros (ABATE-SHEN, 2002). Eles são, ainda, distribuídos em todos os grupos animais - dos eucarióticos aos mamíferos - desempenhando uma peculiar, definida e conservada organização cromossomal provavelmente diretamente relacionada à sua função (CHINOY et al., 1998). No desenvolvimento de mamíferos, os genes homeobox agrupados (HOX) controlam coletivamente a identidade de várias regiões do corpo axial e branquial respeitando uma regra temporal e espacial de colinearidade. Nela, os genes HOX 3' são expressos precocemente no desenvolvimento e controlam as regiões anteriores enquanto que os genes HOX 5' são expressos tardiamente no desenvolvimento controlando as regiões posteriores (Figura 2.1) (CILLO et al., 1999; SAMUEL; NAORA, 2005). Essa organização física dos genes HOX parece ser essencial para sua expressão e é, provavelmente, responsável pela maioria das funções biológicas, ainda não completamente elucidadas, dessa família de genes.

No presente estudo, o único gene homeobox agrupado analisado foi o HOXA7, portanto uma breve descrição do mesmo bem como de sua relação com processos normais e neoplásicos será apresentada a seguir.

Figura 2.1 – Esquema ilustrativo dos genes Hox da *Drosophila* (HOM-C) alinhados com os seus homólogos em humanos (HOX A, B, C e D) e suas respectivas posições cromossômicas (GRIER et al., 2005)

2.3.1 HOXA7

Pertencente à família dos homeobox agrupados, o gene HOXA7 codifica uma proteína de 230 aminoácidos e está localizado no cromossomo 7p15-p14 (NCBI OMIM, 2007a). Ele funciona como um potente repressor de transcrição, cuja função requer vários domínios, incluindo regiões ativadoras e repressoras. Os domínios podem ser diferencialmente utilizados dependendo do ambiente celular e do contexto da ativação do promotor. A complexidade da atuação do HOXA7 é demonstrada pela presença de um domínio de ativação que sugere que em certas situações esse gene possa ativar, mais do que reprimir, a transcrição (SCHNABEL; ABATE-SHEN, 1996).

Dentre as funções conhecidas do gene HOXA7 encontra-se a inibição de genes específicos de diferenciação durante a proliferação de queratinócitos que se dá por meio da ativação de receptores de EGF. Os receptores de EGF ativados estimulam a expressão de HOXA7, diminuindo a diferenciação e favorecendo a proliferação de queratinócitos (LA CELLE; POLAKOWSKA, 2001).

O envolvimento do gene HOXA7 em alguns tipos de tumores já foi verificado. Chang et al. (1998), detectaram maior expressão de transcritos do HOXA7 em papilomas e carcinomas de pele quando comparados à pele normal. Adicionalmente, foi observada associação significativa da expressão desse gene em pacientes com leucemia, principalmente naqueles casos pouco responsivos à quimioterapia convencional (AFONJA et al., 2000). Em carcinomas de ovário bem diferenciados e cistoadenomas, a alta expressão de HOXA7 também foi verificada, por meio de RT-PCR, em carcinomas de ovário pouco diferenciados e no epitélio ovariano normal

(NAORA et al., 2001). Recentemente, a expressão desse gene foi observada no carcinoma epidermóide de esôfago, e, sua maior expressão nessa neoplasia frente ao tecido não-tumoral parece estar associada à progressão tumoral (CHEN et al., 2005).

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, o gene HOXA7 foi detectado, por meio de RT-PCR em tecidos não tumorais e em carcinomas epidermóides. Já por meio da técnica de hibridização *in situ* (ISH), a localização de transcritos desse gene mostrou-se mais intensa na população celular neoplásica de carcinomas epidermóides bem diferenciados, frente aos pobremente diferenciados (MATIZONKAS-ANTONIO, 2005).

2.4 Genes Homeobox não agrupados

A maioria dos genes homeobox está na classe dos homeobox não agrupados, e encontram-se dispersos pelo genoma divididos em famílias baseadas na similaridade das sequências de seus respectivos homeodomínios, e de domínios protéicos adicionais (GILBERT; OPITZ; RAFF, 1996; ABATE-SHEN, 2002). Essas famílias foram nomeadas de acordo com seus homólogos na *Drosófila* tais como *PAX* (“paired”), *EMX* (“empty spiracles”), *OTX* (“orthodenticle”) e *MSX* (“muscle segment homeobox”) (CILLO et al., 1999). Os produtos dos homeobox não-agrupados funcionam, geralmente, como co-fatores das proteínas HOX como é o caso da família TALE (“Three Aminoacid Loop Extension”).

Embora a participação dos genes homeobox na carcinogênese aparentemente seja mais associada na literatura aos genes HOX (ou agrupados), são os genes homeobox não agrupados que mostram associações mais efetivas e consistentes com a carcinogênese como é o caso do TGIF (LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001). Por esse motivo, o presente estudo selecionou um maior número de genes homeobox não agrupados dentre àqueles identificados no Projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço e passa a descrevê-los brevemente a seguir.

2.4.1 ASH2L

O gene ASH2L (do inglês “Absent, small or homeotic discs-2”) é um membro da grande família tritorax da *Drosophila*, com homólogos humanos envolvidos na hematopoiese e associados a alguns tipos de leucemia (WANG et al., 2001). Os genes pertencentes a família tritorax são responsáveis pela manutenção do padrão de expressão dos genes HOX, e particularmente o ASH2L, regula positivamente a expressão de genes homeóticos seletores, além de estar implicado no desenvolvimento e formação precoce de vários segmentos da Drosófila (NCBI, OMIM, 2007b).

Localizado no cromossomo 8p11.2, foi primeiramente identificado por Ikegawa et al. (1999), como um gene altamente homólogo ao ash2 da Drosófila, e, por esse motivo passou a ser denominado em humanos como semelhante ao ash2 (“ash2-like”, ASH2L). O ASH2L humano, apresenta duas formas alternativas de montagem (“splicing” alternativo) denominadas ASH2L-1 e 2, e também apresenta

um domínio de ligação ao DNA chamado dedo de zinco e sítios de fosforilação tirosino-quinases. A quantidade de transcritos desse gene é extremamente alta no fígado e pulmão fetais, testículos, coração e em linhagens celulares de leucemia com potencial eritróide e megacariocítico. Por outro lado, níveis mais baixos de expressão do ASH2L foram observados em órgão adultos como o pulmão, fígado, rim, próstata e leucócitos periféricos (IKEGAWA et al., 1999; WANG et al., 2001).

Contendo 6 éxons, o gene ASH2L tem sido sugerido como regulador transcricional (IKEGAWA et al., 1999). Mais recentemente foi demonstrado, em leveduras, a associação da proteína ASH2L com o HCF-1, um conhecido fator de proliferação celular em mamíferos e ligado à transcrição do vírus do herpes simples. Essa associação parece promover uma atividade de metilação dos repressores transcricionais (K4 e K9), por meio da associação do complexo ASH2L/HTM (histona metiltransferase) com o fator HCF-1 que promove interações exclusivas que podem estar envolvidas na regulação transcricional do vírus do herpes simples (WYSOCKA et al., 2003).

O gene ASH2L é mais estudado no desenvolvimento, porém seus transcritos foram identificados por meio de RT-PCR e localizados por ISH em CEBs num estudo preliminar em nosso laboratório. Nessa oportunidade, discreta presença de ASH2L foi verificada em células neoplásicas principalmente naquelas pertencentes a carcinomas pouco diferenciados (Dados não publicados).

2.4.2 HHEX

Pertencente à família dos homeobox não agrupados, o HHEX (também conhecido como Hex, do inglês “Hematopoietically Expressed Homeobox”) representa um fator de transcrição expresso principalmente durante a hematopoiese (LIAO et al., 2000) que foi primeiramente denominado prh (homeobox rico em prolina). Altamente conservado em vertebrados, seu isolamento e sequenciamento completos foram realizados a partir de uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) de leucemia mielóide aguda e, sua localização, em humanos, é o cromossomo 10q24 codificando uma proteína de 271 aminoácidos (NCBI OMIM, 2007c).

O HHEX funciona como um repressor transcricional em células do fígado e pode estar envolvido na diferenciação e/ou manutenção do estado de diferenciação dos hepatócitos (TANAKA et al., 1999). Adicionalmente, ele apresenta funções nos múltiplos estágios do desenvolvimento das células B (exceto em plasmócitos), atua como regulador negativo de hemangioblastos e, embora bastante implicado na hematopoiese, sua presença parece ser restrita a algumas linhagens celulares como, por exemplo, as células progenitoras mielóides, células da medula óssea e células linfóides (BEDFORD et al., 1993). Dentre as células não-hematopoéticas, o HHEX é também encontrado em células do fígado mas não em fibroblastos, células da placenta ou células HeLa. Além disso, é também descrito seu envolvimento no desenvolvimento cardíaco fetal (FOLEY; MERCOLA, 2005).

Embora existam poucos relatos da participação do HHEX na oncogênese, é descrito que uma variedade de linfomas de células-B apresenta sua expressão diminuída de acordo com o grau de diferenciação celular (WANG et al., 1999). Além disso, esse gene foi identificado em alguns tecidos adultos de origem endodermal incluindo o fígado e a tireóide (D’ELIA et al., 2002; PUPPIN et al., 2006). Sua

expressão foi identificada por RT-PCR em adenomas e carcinomas diferenciados de tireóide (papilar e folicular) e em tecidos normais (D'ELIA et al., 2002).

A presença do HHEX em tecidos mamários foi descrita através da localização dessa proteína no núcleo e citoplasma das células desse tecido. Interessantemente, a ausência dessa proteína no núcleo tem sido observada durante a transformação neoplásica de células foliculares da tireóide e durante a tumorigênese de mama. A perda de expressão nuclear de sua proteína também foi verificada em tecidos mamários durante a lactação o que sugere que o HHEX possa participar na diferenciação de células epiteliais mamárias, além de participar de processos tumorais de mama (PUPPIN et al., 2006).

Recentemente, o envolvimento do gene HHEX no diabetes do tipo 2 foi relatado por meio da identificação de polimorfismos desse gene em pacientes susceptíveis ao diabetes do tipo 2 (SLADEK et al., 2007; SCOTT et al., 2007).

Em nosso laboratório, por meio da técnica de hibridização in situ (ISH), o gene HHEX foi detectado mais intensamente em ilhotas neoplásicas de carcinomas epidermóides de boca, decrescendo com o aumento da diferenciação histológica. Já em tecidos não tumorais a presença desse gene foi observada nos vasos sanguíneos (CAZAL, 2004).

2.4.3 PITX1

O gene PITX-1 ("Paired-like Homeodomain Transcription Factor 1") foi caracterizado inicialmente em camundongos, como um gene capaz de codificar

proteínas com função de fatores de transcrição ativadoras do gene da proopiomelanocortina (POMC) na pituitária, e, por isso passou a ser chamado de PTX1, do inglês “Pituitary homeobox 1” (LAMONERIE et al., 1996). Também conhecido como BFT (“backfoot”) devido a sua relação com a morfogênese dos membros inferiores, esse gene está localizado na região 5q31 em humanos e teve sua expressão relacionada à síndrome de Treacher Collins (CRAWFORD et al., 1997). O gene PITX1 e seus homólogos na *Drosófila* parecem estar envolvidos no desenvolvimento das estruturas anteriores e, em particular, com o cérebro e com a face sendo definidos como fatores de transcrição (NCBI, OMIM, 2007d).

Transcritos do gene PITX1 foram encontrados em diferentes tipos de adenomas da pituitária e sua expressão, nesses casos, foi reduzida em mais de 50% quando comparada ao gene constitutivo GAPDH (SKELLY et al., 2000). Sua baixa expressão também foi verificada por microarray em amostras de CEBs e mucosa normal (MORIYA et al., 2003) e em esôfago de Barrett (um conhecido modelo multi-estágio de carcinogênese) sugerindo seu envolvimento na sequência metaplasia-displasia-adenocarcinoma de Barrett (LORD et al., 2005).

O gene PITX1 tem sido descrito como um supressor de tumor em vários cânceres, e recentemente, sua baixa expressão foi observada em tecidos normais e tumorais de pulmão comparados à tecidos pulmonares normais. Além disso, uma associação entre a perda de expressão de PITX1 e o alto grau do tumor de pulmão foi observada, sugerindo que esse gene esteja ligado ao desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão (CHEN et al., 2007).

É descrito na literatura que a inibição do PITX1 induz a tumorigênese relacionada à via do RAS - uma conhecida via ligada instalação e progressão de diversos cânceres. Nesse sentido, foi observada a baixa expressão desse gene em

tumores da bexiga e próstata e em células de câncer de cólon contendo o tipo selvagem do RAS. Porém, a restauração de PITX1 nesses casos foi capaz de inibir a tumorigenicidade dependente do RAS selvagem. Adicionalmente, a proteína RASAL1 (“proteína ativando a RAS-GTPase”) foi identificada como um alvo de transcrição através do qual PITX1 afeta a função do RAS. Desse modo, sugere-se que o PITX1 suprima a tumorigenicidade via regulação negativa da via do RAS por meio da proteína RASAL1 (KOLFSCHOTEN et al., 2005).

Outros estudos já relataram a amplificação de transcritos do PITX-1 em neoplasias benignas da pituitária (TAHARA et al., 2000), porém sua participação na carcinogênese de boca permanece pouco estudada.

Em carcinomas epidermóides de boca, sua expressão foi verificada e localizada, por meio de RT-PCR e ISH respectivamente. Embora também presente no epitélio de revestimento de tecidos não-tumorais, sua localização no tumor mostrou-se preferencialmente próxima às pérolas de queratina (LIBÓRIO, 2004).

2.4.4 PKNOX1

É descrito que um gene homeobox típico codifica um domínio de proteínas (homeodomínio) de 60 aminoácidos, porém, alguns grupos com homeodomínios atípicos têm sido observados levando à revisão de suas classificações (BÜRGLIN, 1997). Um exemplo é a superclasse TALE que contém 3 aminoácidos extras entre as hélices 1 e 2 e são representados, em animais, pelas classes PBC, MEIS, IRO e TGIF. Membro dessa família, o gene PKNOX1 (“PBX/knotted homeobox”) foi

mapeado em humanos na região 21q22.3, localização próxima à zona crítica da Síndrome de Down (BERTHELSEN et al., 1998), estando superexpresso em cérebros fetais acometidos pela síndrome (SÁNCHEZ-FONT, et al., 2003).

Esse gene é um parceiro das proteínas PBX (“pre B-cell leukemia transcription factor”) e da família “plant knotted-1”, envolvida com o desenvolvimento de plantas, mostrando-se presente em diversos órgãos e tecidos como coração, cérebro, placenta, pulmão, fígado, músculo e tecidos fetais (CHEN et al., 1997).

O PKNOX1 possui duas variantes de montagem, uma com transcritos de 4997 pares de base (NM_004571) e outra com 2830 pares de base (NM_197976). Mais descritos no desenvolvimento, os membros da família TALE costumam se ligar ao DNA de forma heterodimérica, desse modo, foi demonstrado que interações entre alguns de seus membros tais como PKNOX1 e PBX1 parecem estar envolvidas na regulação tecido-específica da produção de colágeno tipo V (PENKOV et al., 2000) e também na regulação de leucemias mielóides murinas (KNOEPFLER et al., 1997). Além disso, a descrição do gene PKNOX-1 como ativador transcricional do vírus da leucemia murina (Vírus de Moloney, MLV), e como estimulador da atividade de células-tronco hematopoiéticas, é realizada na literatura recente (CHAO et al., 2003; DI ROSA et al., 2007).

De um modo geral, a ação do gene PKNOX1 tem sido mais estudada no processo de embriogênese e desenvolvimento, e, sua participação em processos neoplásicos merece maiores investigações. Por esse motivo, sua expressão em CEB foi estudada em nosso laboratório. Utilizando-se a técnica de ISH, não pôde ser verificada a presença de PKNOX1 no epitélio não neoplásico, porém discreta marcação ocorreu nas células neoplásicas (Dados não publicados).

2.4.5 TGIF

Assim como o PKNOX1, o gene TGIF (“TGF β -induced factor”) é um homeobox não agrupado pertencente à família TALE localizado no cromossomo 18p11.3, que codifica uma proteína que consiste de 272 aminoácidos (NCBI, OMIM, 2007e). Ele é um fator de transcrição bastante descrito em vertebrados (BÜRGLIN, 1997), envolvido na proliferação e diferenciação celular (IMOTO et al., 2000) e que parece atuar em várias vias de regulação transcricional como repressor ligado ao DNA ou como co-repressor em associação a outras proteínas ligantes ao DNA (WOTTON et al., 1999). Ele tem sido relacionado a muitos processos biológicos durante o desenvolvimento humano, e, foi recentemente identificado como parte de um pequeno grupo de genes implicados com a holoprosencefalia (CHEN et al., 2003).

O TGIF também participa de uma variedade de vias de sinalização. Bertolino et al. (1995), descobriram que o TGIF é capaz de competir com o ácido retinóico pela ligação a sítios promotores, inibir a proliferação celular e induzir à diferenciação celular e apoptose. Outro importante papel desempenhado por esse gene é a inibição da via de sinalização do TGF- β (fator de crescimento transformante). Isso acontece por meio da interação do TGIF com as proteínas Smads levando à repressão da transcrição mediada pelas Smads 2 e 4. Após a fosforilação mediada pelo receptor de TGF- β , a Smad 2 forma um complexo com a Smad 4 e é translocada para o núcleo a fim de regular a transcrição de diferentes genes. Uma vez no núcleo, esse complexo interage com co-ativadores para ativar a transcrição via TGF- β . Alternativamente, esse complexo pode interagir com co-repressores,

como é o exemplo do TGIF, formando um complexo transcricional repressor que inibe a ação anti-proliferativa dependente de TGF- β . Portanto, o gene homeobox TGIF é relatado como um gene responsivo ao TGF- β (WOTTON et al., 1999; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001).

Em adição, Lo, Wotton e Massagué (2001), relataram que a via de sinalização do TGF- β interage com a via de sinalização EGF/Ras/MAPK (proteína mitogênica quinase ativada), o que poderia fosforilar o TGIF prolongando sua meia-vida, aumentando os níveis de sua proteína e favorecendo, assim, a formação do complexo repressor Smad2-TGIF. Essa regulação via EGF/Ras/MAPK permite o ajuste seletivo e efetivo do nível de transcrição ativado pelas Smads. Desse modo, o TGIF promove, dentro do núcleo, uma ligação potencial entre os sinais das vias EGF/Ras/MAPK e TGF- β . Além disso, sua estabilização via EGF/Ras/MAPK seria responsável por um mecanismo de modificação da resposta das Smads. Essa modificação, por sua vez, é expressa pela aquisição de resistência à inibição de crescimento mediada pelo TGF- β que leva a outras respostas como a produção de matriz extracelular, mobilidade celular e estimulação da angiogênese.

Borlak et al. (2005), sugeriram que a superexpressão do TGIF seria um dos eventos iniciais na transformação de células hepáticas normais em células malignas.

Adicionalmente, estudos realizados em nosso laboratório, identificaram a presença de transcritos do gene TGIF em tecidos não tumorais e em carcinomas epidermóides por meio de RT-PCR. Utilizando a técnica de ISH, a localização desses transcritos mostrou-se mais intensa em carcinomas epidermóides bem diferenciados quando comparados aos pouco diferenciados (MATIZONKAS-ANTONIO, 2005). Desse modo, ainda que se conheça algumas das principais características do TGIF, seu papel no CEB permanece desconhecido.

2.5 Genes Homeobox e os fatores de crescimento e diferenciação celular

A regulação gênica tecido-específica resulta da ação de uma variedade de fatores de transcrição, como as homeoproteínas, que impõem seus efeitos sobre os genes alvo por meio da ativação e da repressão da transcrição (BERTOLINO et al., 1995). Nesse contexto, os mecanismos de interação entre as homeoproteínas, citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão são essenciais à sobrevivência da célula, e, o conhecimento de seu funcionamento pode contribuir ao entendimento dos mais variados processos que ocorrem no organismo (EDELMAN; JONES, 1993). Graças a essas moléculas, a sinalização intracelular e intercelular é possibilitada e, por sua vez, a regulação da expressão gênica é estabelecida.

Os genes homeobox têm atraído a atenção como reguladores globais de diversos processos durante o desenvolvimento embrionário, pois codificam proteínas que funcionam como fatores de transcrição regulando a expressão gênica (CHINOY et al., 1998).

Adicionalmente, é descrito que nas etapas iniciais do processo de sinalização celular as proteínas envolvidas são, fundamentalmente, as famílias FGFs (Fatores de crescimento de fibroblastos), TGFs (fator de crescimento transformante) e EGF (fator de crescimento epitelial). Porém, uma interação entre os genes homeobox e esses fatores de crescimento e diferenciação celular é pouco descrita. Nesse sentido, foi demonstrado em culturas de tecido que o desenvolvimento do pulmão, do qual os genes homeobox participam, pode ser acelerado por meio de estímulos mecânicos e pela aplicação combinada de fatores de crescimento e hormônios (EGF, TGF β 1, e dexametasona) (CHINOY et al., 1998).

Porém, as interações entre os homeobox e os fatores de crescimento e diferenciação celular, bem como sua participação como fator de transcrição em regiões específicas ou na diferenciação celular tecido-específica, ainda não foram completamente elucidadas.

A seguir, uma breve descrição a respeito dos fatores de crescimento EGF e TGF β , utilizados no presente estudo, será realizada.

2.5.1 EGF (Fator de crescimento epitelial)

O fator de crescimento epitelial (EGF), tem um profundo efeito na diferenciação de células específicas, *in vivo*, além de ser um potente fator mitogênico para uma variedade de células de origem mesodérmica e ectodérmica (CARPENTER; COHEN, 1979). Sua influência na divisão, na migração, na adesão, na diferenciação e na apoptose celulares por meio de uma via tirosino-quinase é bastante discutida, e, atualmente, tem sido demonstrado que os ligantes para os receptores de EGF, bem como seu RNA mensageiro, possuem maior expressão em neoplasias de cabeça e pescoço quando comparadas à mucosa normal (GRANDIS; TWEARDY, 1993; NORMANNO et al., 2003). Essa expressão aumentada também tem sido verificada em vários outros tipos de neoplasias tais como câncer de mama, de ovário e de próstata (DICKSON et al., 1993; CIARDELLO; TORTORA, 1998).

É descrito, que a expressão do receptor de EGF (EGFR) aumenta com a severidade da displasia em lesões pré-malignas de cabeça e pescoço, sugerindo essa alteração como um evento genético precoce no estabelecimento do câncer de

cabeça e pescoço (GRANDIS; TWEARDY, 1993; GRANDIS et al., 1998). Adicionalmente, estudos têm relatado que aumentos nos níveis de expressão de EGFR indicam maior taxa de recorrência e prognóstico ruim (DASSONVILLE et al., 1993; STANTON et al., 1994; KIM; CALIFANO, 2004). Desse modo, é sugerido que a expressão do EGFR poderia ser utilizada como um marcador imunoistoquímico prognóstico, assim como bloqueadores para este receptor seriam úteis para se impedir a proliferação de células tumorais (GRANDIS et al., 1998; NORMANNO et al., 2003).

O EGF tem sido relatado envolvido em diversos processos relacionados à carcinogênese e à invasão tecidual, estando superexpresso em mais de 90% deles (GRANDIS; TWEARDY, 1993). Ele confere, ainda, radioresistência e proporciona capacidade de recorrência às neoplasias de cabeça e pescoço (GUPTA et al., 2001). Ainda nesse sentido, a regulação negativa da expressão do EGFR e a indução de apoptose reversível foram obtidas, em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, por meio da utilização do gene Adenoviral *E1A* (FLINTERMAN et al., 2003). Esses achados possibilitaram o estabelecimento de uma nova via remetendo à apoptose mediada por *E1A* e identificaram o EGFR como um alvo em potencial para terapias contra o câncer de cabeça e pescoço o que também é confirmado por outros trabalhos (JANMAAT; GIACCONE, 2003; NYATI et al., 2006).

A existência de quatro receptores de EGF ou também chamados de receptores de ErbB é descrita. São eles: o EGFR (receptor de EGF, HER ou ErbB); ErbB2 (também conhecido como Neu ou HER-2); ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Cada um deles consiste de um domínio extracelular rico em cisteína, um domínio intra-membrana, um grande domínio tirosino-quinase citoplasmático e de muitos resíduos tirosino-quinases que são fosforilados após a ativação do receptor. O

acoplamento dos ligantes (EGF e $TGF\alpha$, por exemplo) estimula a dimerização do EGFR e a fosforilação de resíduos de tirosina em diversos sítios; estes passam a atuar como proteínas efetoras e formadoras de complexos responsáveis por diferentes respostas fisiológicas (RIESE; STERN, 1998). O EGF ativa diversas vias de sinalização como, por exemplo, a via ras/MAPK que é associada às cascatas de serina/tirosina e que tem a função de regular a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (PERSONS; YAZLOVITSKAYA; PELLING, 2000). Além desta via, o EGF ativa também a via PI3K (fosfatidilinositol'3'-quinase) que ativa o Akt que, por sua vez, leva à propagação de outros fatores relacionados às vias de sobrevivência celular (SOTSIOS; WARD, 2000).

Durante o desenvolvimento do fenótipo metastático, as células tumorais adquirem propriedades biológicas distintas daquelas observadas nos tumores primários. Isso inclui o aumento da motilidade, a habilidade de degradar a matriz extra celular (MEC) e uma maior sobrevivência celular, eventos esses, mediados por citocinas e fatores de crescimento (MIYAZAKI et al., 2006). O EGF é um dos fatores associados aos fenômenos acima reportados, uma vez que ele representa um estimulador do crescimento epitelial também capaz de ativar vias de sinalização envolvidas na motilidade celular (WELLS et al., 1998).

Assim como o $TGF-\beta$, o EGF é capaz de promover a progressão tumoral por meio da ativação de vias de sinalização distintas ou sobrepostas, incluindo os mecanismos dependentes de MAPK e de PI3K (DUMONT; BAKIN; ARTEAGA, 2003), porém os alvos moleculares que sinalizam essa promoção tumoral ainda não são claramente definidos.

É descrito que o EGF parece aumentar o potencial invasivo de células de CEB metastático enquanto que, em células CEB primário, estimula a taxa de

proliferação (YEUDALL et al., 2005). Mais adiante, Miyazaki et al. (2006), verificaram que células de CEB metastático estimuladas com EGF apresentaram superexpressão de 67 genes e subexpressão de outros 113. Dentre os genes pouco expressos estavam numerosas queratinas como é o caso da queratina 6E enquanto que genes ligados à progressão tumoral tais como integrina $\alpha 2$ e ciclina D1 estavam superexpressos. Genes como vimentina e laminina $\alpha 3$ foram superexpressos em linhagens metastáticas estimuladas com EGF e com TGF- β . Isso sugere que de um modo geral, as ações do EGF e do TGF- β parecem afetar diferentemente a expressão gênica em células de CEBs primário e metastático, porém ambos contribuem com propriedades metastáticas via regulação de mediadores comuns e específicos.

Uma relação entre genes da família homeobox e o fator de crescimento EGF já foi previamente estabelecida. Em *Drosophila* um gene homeobox denominado *mirr* é induzido pela via do EGFR (JORDAN et al., 2000). Porém, a relação entre o EGF e os genes homeobox no câncer está insuficientemente estudada, e pouco estabelecida no câncer de boca.

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo da via de sinalização do EGF (Retirado de: www.biocarta.com/pathfiles/egfPathway.gif)

2.5.2 TGF- β (Fator de crescimento transformante)

Muitas pesquisas têm mostrado que a maioria das neoplasias está associada com o TGF- β (fator de crescimento transformante). Adicionalmente, várias delas se mostram hábeis para resistir à inibição de crescimento mediada por esse fator (HU et al., 2005). O TGF- β pertence a uma família de citocinas multifuncionais, que é composta por três proteínas altamente homólogas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), encontradas inicialmente, *in vivo*, na forma latente. Suas isoformas são sintetizadas como precursores diméricos, e são clivadas durante a secreção de citocinas

maduras. Na forma madura, o TGF- β permanece associado com um pró-peptídeo (peptídeo associado a latência - LAP) também chamado complexo menor de latência (SLC) (THOMAS et al., 2002).

Os ligantes de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) são descritos como potentes inibidores do crescimento de tecidos epiteliais normais, reguladores da diferenciação e migração celular, e, por essa razão têm sido considerados altamente protetores contra o câncer (BIERIE; MOSES, 2006). Porém, dos três ligantes acima descritos, o TGF- β 1 parece ser o mais frequentemente regulado positivamente em células tumorais (DERYNCK; ZHANG, 2003). Esse fato é reforçado no estudo de Miyazaki et al. (2006), no qual foi demonstrado que das três isoformas do TGF- β , é o TGF- β 1 aquela que mais induz células de CEB metastático à invasão.

Em adição, o TGF- β parece participar de outros processos que envolvem a inibição de crescimento tecidual, incluindo a manutenção da estabilidade genômica, a indução da senescência, a supressão da atividade da telomerase e a prevenção da angiogênese inapropriada (THOMAS et al., 2002; BIERIE; MOSES, 2006). Atualmente, é sugerido que o TGF- β tenha efeitos bifásicos durante a tumorigênese, agindo em estágios iniciais como um supressor de tumor por meio do efeito negativo de crescimento, e em estágios mais tardios estimulando a progressão do câncer (aumentando a taxa de malignidade e a invasividade) através de mecanismos epigenéticos. (AKHURST; DERYNCK, 2001; BIERIE; MOSES, 2006; MIYAZAKI et al., 2006). Sendo assim, alterações genéticas e epigenéticas são apontadas como responsáveis pelo seu envolvimento no crescimento e na progressão tumoral (BIERIE; MOSES, 2006).

Embora a participação do TGF- β na biologia do tumor esteja envolvida com complexas vias de sinalização, alguns estudos demonstraram que o TGF- β pode ser

um proto-oncogene, dirigindo a progressão da malignidade para a invasão e as metástases (AKHURST; DERYNCK, 2001; THOMAS et al., 2002; MIYAZAKI et al., 2006). Dentro da sua via de sinalização, os efetores da sinalização intracelular do TGF- β , as proteínas Smad, são ativadas por receptores e translocadas para o interior do núcleo, onde regulam a transcrição. Embora essa via seja simples, interações combinatórias entre o receptor heteromérico e o complexo Smad, entre o receptor interativo e as proteínas interativas Smad, e a cooperação com fatores de transcrição sequência-específicos promovem substancial versatilidade e diversificação das respostas da família TGF- β . Essa versatilidade também pode ser verificada na capacidade de ativar a via de sinalização Smad-independente que os receptores de TGF- β apresentam. Essa via Smad-independente não só regula a sinalização das Smads como também promove respostas TGF- β Smad-independentes (DERYNCK; ZHANG, 2003).

Estudos têm identificado mutações nos componentes que são associados com a via de sinalização do TGF- β , e que se relacionam com a ocorrência e com o prognóstico do câncer em diversos tecidos humanos. Adicionalmente, a super expressão de TGF- β 1 tem sido associada a tumores de mama, de cólon, de esôfago, gástrico, hepatocelular, de pulmão e pancreáticos bem como aos fenômenos de progressão, metástase, angiogênese e prognóstico ruim (BIERIE; MOSES, 2006).

Em relação aos tumores de cabeça e pescoço, efeitos inibitórios do TGF- β 1, determinados principalmente em cultura de células, têm sido relatados na literatura. Nesse sentido, o controle de escape do TGF- β 1 vem sendo sugerido como um dos mecanismos para explicar a progressão de carcinomas epidermóides. A perda da expressão da proteína TGF- β 1 é uma das primeiras mudanças na progressão pré-

maligna em queratinócitos, e a deleção desse gene causa a progressão de papilomas a carcinomas epidermóides. Isso foi demonstrado por meio da verificação de que linhagens celulares de carcinomas orais produzem menos TGF- β 1 autócrino do que células epiteliais normais (LOGULLO et al., 2003). Adicionalmente, é relatado que a perda ou diminuição da expressão da proteína TGF- β 1 representa um evento comum em carcinomas de cabeça e pescoço estando, na cavidade oral, associada com diferenciação. Porém, a significância da presença ou ausência de TGF- β 1 pode variar de tumor para tumor o que explica porque a expressão de TGF- β 1 não deve ser associada ao prognóstico (LOGULLO et al., 2003).

Paterson et al. (2001) relataram que, em linhagens de carcinomas orais, as células tumorais escapam da regulação negativa de crescimento produzindo menos TGF- β 1 autócrino. Nesse estudo os autores analisaram a expressão do TGF- β 1, 2 e 3 junto com a expressão de T β RI (receptor TGF- β tipo I) e T β RII (receptor TGF- β tipo II) em tecidos epiteliais orais normais, em carcinomas epidermóides orais primários e em linfonodos metastáticos para determinar, a que ponto, anormalidades nessas proteínas podiam ser desenvolvidas na carcinogênese oral humana. Seus resultados demonstraram que a expressão de T β RII em relação ao T β RI decresceu durante a progressão do tumor. Em uma série de linhagens celulares derivadas de carcinomas orais, as estruturas de T β RI e T β RII foram normais sugerindo que as alterações na expressão gênica da carcinogênese oral são provavelmente mais importantes do que os defeitos estruturais dos receptores de TGF- β . Finalmente, eles demonstraram que baixos níveis de TGF β RII levam à seletiva regulação gênica com a redução da inibição de crescimento pelo TGF- β 1 e continuada pela regulação transcricional dos genes associados à matriz celular. Nesse contexto, a repressão transcricional do TGF β RII mostra-se particularmente importante, e parece ser um

modo de regulação responsável pela maior parte da resistência associada ao TGF- β observada *in vivo*.

Recentemente, a complexa natureza da sinalização do TGF- β passou a representar uma oportunidade para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas câncer-específicas (BIERIE; MOSES, 2006), e, o conhecimento de sua interação com genes envolvidos na carcinogênese passou a ser fundamental. Nesse sentido, uma interação entre o gene da família homeobox TGIF e o TGF- β já foi inicialmente descrita. Nela, esse gene representa um co-repressor capaz de inibir a via de sinalização do TGF- β e levar à progressão tumoral (WOTTON et al. 1999; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001). Assim como no caso do EGF, a relação entre o TGF- β e os genes homeobox no câncer está insuficientemente estudada, e pouco estabelecida no câncer de boca.

Figura 2.3 – Esquema ilustrativo da via de sinalização do TGF-β (Retirado de: www.biocarta.com/pathfiles/tgfbPathway.gif)

3 PROPOSIÇÃO

Analisar, pela técnica de PCR em tempo real, o perfil de expressão dos genes ASH2L, HHEX, HOXA7, PKNOX1, PITX1 e TGIF, em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca, e em linhagem não-tumoral, tratadas com EGF e TGF- β 1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP sob o número 57/06 (Anexo A). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados nos laboratórios de Biologia Celular (sob a supervisão do Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr), Patologia Molecular (sob a supervisão do Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes), ambos da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, e no Laboratório de Genética Molecular e Genomas da UNIVAP (sob a supervisão do Prof. Dr. Francisco G. Nobrega). As etapas são descritas, em detalhes, a seguir.

4.1 Cultivo de celular

Foram utilizadas linhagens celulares de carcinoma epidermóide, cedidas pelo Prof. Dr. dos Décio Santos Pinto Júnior, estocadas em freezer de nitrogênio líquido e crioprotegidas por di-metil-sulfóxico (DMSO – Sigma). Estas linhagens foram previamente estabelecidas no NIH (National Institute of Health, MD, USA) conforme descrito em Cardinali et al. (1995). As linhagens e suas respectivas localizações são: HN-6 (carcinoma epidermóide primário de base da língua), HN-31 (metástase de carcinoma epidermóide de faringe) e HaCaT (linhagem não-tumoral, queratinócitos imortalizados). As células foram descongeladas em banho de água a 37°C por 2 min sendo a seguir transferidas para um tubo de centrifugação contendo 10 ml de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma), suplementado com 10% do soro

fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma). As células foram levadas à centrifuga (200 x g por 2 min), o sobrenadante aspirado e o precipitado de células dissolvido com DMEM suplementado com SFB. A suspensão de células foi transferida para frascos para cultivo celular de 25 cm² contendo 5 ml de DMEM suplementado com soro e mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado em microscópio de fase e o meio de cultura trocado a cada 1-2 dias conforme o metabolismo celular. Ao atingirem confluência de 100%, o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS 1X estéril pH 7.2 ("phosphatase buffer saline"), e destacadas com Tripsina (Sigma) durante alguns minutos dependendo do tipo celular. A enzima foi inativada com DMEM acrescido de SFB e as células em suspensão foram centrifugadas a 200 x g durante 5 minutos. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi dissolvido em meio de cultura fresco e alíquotas foram distribuídas em placas de Petri de 75 cm² e mantidas em estufa até atingirem subconfluência de 70%. Durante as manipulações com as células, amostras representativas foram novamente congeladas em nitrogênio líquido.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, após as células atingirem a subconfluência de 70% quando foram divididas nos grupos experimentais, e submetidas aos diferentes tratamentos e análises descritos a seguir:

4.1.1 Células sem tratamento (grupo Controle)

Para proceder as medidas basais das células, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS 1X (pH 7,2) gelado. Para a extração de RNA às células foram acrescidos de 1,5 a 2 ml de TRizol (Gibco), conforme instruções do fabricante. Os lisados celulares foram homogeneizados na solução de TRizol e armazenados em tubos de microcentrífuga a temperatura de -80°C , até a realização do procedimento de extração de RNA.

4.1.2 Células tratadas EGF e TGF- β 1 (Grupo experimental)

Para o estabelecimento dos grupos experimentais, o meio antigo foi aspirado, as células foram lavadas com PBS 1X (pH 7,2) estéril e mantidas em estufa à 37°C por 24 h em DMEM sem soro. Esse procedimento de privação do soro é descrito na literatura e visa eliminar estímulos provenientes do SFB promovendo a verificação apenas da ação de cada fator de crescimento utilizado. Transcorrido esse período, as células foram separadamente tratadas com 10ng/ml de EGF (Sigma) e 5ng/ml de TGF- β 1 (Calbiochem) reconstituídos respectivamente com DMEM e HCl 4mM em 0,1% BSA, de acordo com as instruções dos fabricantes. As células foram submetidas à estufa 37°C por 18 h, e, por fim, lavadas com PBS 1X (pH 7,2) gelado. Para a posterior extração de RNA, as células foram acrescidas de 1,5 a 2 ml de TRizol (Gibco), conforme instruções do fabricante. Os lisados celulares foram homogeneizados na solução de TRizol e armazenados em tubos de microcentrífuga a temperatura de -80°C conforme já descritos no item a (Grupo controle) até a realização do procedimento de extração de RNA.

Figura 4.1 – Esquema ilustrativo dos grupos Controle e Experimental

4.2 Curvas de crescimento celular

Visando caracterizar as diferentes linhagens celulares utilizadas nesse estudo, curvas de crescimento e proliferação das mesmas foram realizadas utilizando-se o kit Cell Titer96 (Promega, Madison, Wiscosin, USA). Esta reação é baseada na conversão celular do sal tetrazolium incolor (MTS), em formazam azul, por enzimas de desidroxigenase presentes em células metabolicamente ativas. Desse modo, espera-se que os poços que possuírem mais células viáveis produzam maior quantidade de sal formazam tornando o meio mais azulado. As células foram cultivadas e 50×10^4 delas foram plaqueadas, em triplicatas, em placas de 96 poços e mantidas em estufa sob as condições previamente descritas (itens 4.1.1 e 4.1.2). Após a realização das condições experimentais (grupo sem tratamento e grupos com tratamento por 18 horas), o meio antigo foi aspirado, 200 μ l de DMEM e 20 μ l de solução do kit Cell Titer96 foram adicionados aos poços e incubados em estufa a 37°C por 3 horas, de acordo com as recomendações do fabricante. Transcorrido

esse período, as placas foram levadas ao espectrofotômetro (ELX 800 Bio-Tek Instruments Inc.) e a leitura de absorbância realizada utilizando o filtro de 490 nm. Quantidades diferentes e conhecidas de células foram plaqueadas para estabelecimento de uma curva-padrão usada como referência para as leituras de absorbância.

4.3 Extração do RNA

As células armazenadas em Trizol foram brevemente homogeneizadas, mantidas durante 5 min. a temperatura ambiente e posteriormente por 5 min no gelo. Para cada ml de Trizol utilizado foram adicionados 250 µl de clorofórmio e mantidos durante 3 min. a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, durante 15 min. a 4°C e a fase aquosa coletada. A ela foram adicionados 500 µl de isopropanol, permanecendo durante 30 min. no gelo. Após nova centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min. a 40°C, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado com 1 ml de etanol 75%, e então centrifugado a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C. Finalmente o precipitado foi dissolvido em 25 a 30 µl de água DEPC e a quantidade de RNA obtida verificada através de leitura em espectrofotômetro (Beckmann DU-640). A leitura da absorbância foi realizada e a produtividade da reação calculada pela fórmula: $OD \times \text{diluição} \times 40/1000$. Todos os RNAs utilizados apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0 e tiveram sua qualidade verificada em gel de integridade sendo considerado ótimo quando as bandas 28S e 18S de rRNA apresentaram-se nítidas e intensas numa relação de 2:1 (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Esquema ilustrativo da extração de RNA pelo método TRizol (Invitrogen) e de gel de integridade para verificação da qualidade do RNA obtido

4.4 RT-PCR

Procedeu-se a confecção de cDNA (DNA complementar) pela técnica do RT-PCR utilizando a enzima Superscript II (Invitrogen). Para tal foram adicionados: 2 µl de oligo dT (Invitrogen) à 4 µg de RNA extraído das linhagens celulares e água milli-Q livre de RNase e DNase perfazendo um volume final de 20 µl. Os tubos foram aquecidos a 70 °C por 10 minutos, resfriados rapidamente e adicionados a cada tubo tampão apropriado, DTT e dNTPs. Os tubos permaneceram 10 min. a temperatura de 25°C, seguido de aquecimento a 42°C por 2 min. A cada tubo foi adicionado 1 µl da enzima Superscript (Invitrogen), mantendo-os a 42°C por 50 min. e a reação finalizada a 70°C por 15 min, conforme instruções do fabricante. Os cDNAs obtidos foram armazenados em freezer - 20°C para posterior utilização.

4.4 Reação de PCR convencional

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR convencional utilizando iniciadores específicos para os diferentes genes estudados. Esse procedimento foi realizado a fim de verificar a presença dos transcritos dos genes estudados nas linhagens celulares utilizadas antes dos ensaios quantitativos. Os iniciadores utilizados já haviam sido previamente confeccionados para outros estudos realizando em nosso laboratório, utilizando o programa Gene Tool 1.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá) e podem ser observados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Sequência dos iniciadores utilizados para as reações de PCR convencional em relação ao gene, ao número de acesso no Gene Bank, ao sentido e ao tamanho do produto

Gene	No. acesso	Iniciadores 5' → 3'	Posição	Produto
ASH2L	NM_004674	Senso: catgatcgagctccccagtaaa Anti-senso: agtgagatggctgggaagtaaac	1160-1182 1707-1685	548 pb
HHEX	NM_002729	Senso: ccctgggcaaacctctactctg Anti-senso: atggccctcaatgtccacttct	400-421 830-811	431 pb
HOXA7	NM_006896	Senso: tgcctgcgcctcctacgacc Anti-senso: cggcggcagtcggaccttctg	371-391 724-704	354 pb
PITX1	NM_002653	Senso: aaggggcccaggacagtgg Anti-senso: gctgagaacatggactgccagga	610-630 1064-1047	455 pb
PKNOX1	NM_004571	Senso: gaccccgatggatgtggacaagc Anti-senso: gccggcaccacaattccctgagg	332-354 766-744	435 pb
TGIF	NM_170695	Senso: ggctcctccctgacatgctg Anti-senso: tgcaacatccactagaagcgt	1049-1068 1545-1527	497 pb

Pb: pares de base

Para cada gene foram utilizadas diferentes quantidades de reagentes e condições de ciclagens conforme pode ser verificado, respectivamente, nas Tabelas 4.2 e 4.3. Porém, para cada tubo foram adicionados os seguintes constituintes na concentração final descrita: cDNA, iniciadores senso e anti-senso (5 a 10 μmol), dNTP (de 200 a 400 μM), tampão sem MgCl_2 (1X), MgCl_2 (1 a 4mM), 2U de enzima (Platinum *Pfx* Polimerase, Invitrogen) e água milli-Q livre de RNase e DNase perfazendo um total de 25 μl por reação. Para cada reação de PCR, foram utilizados, ainda, 1 controle negativo (omissão do cDNA) e 1 controle positivo (cDNA de embrião de camundongo) além da amplificação com genes constitutivos. Para tal, os genes constitutivos β -actina, GAPDH, HPRT e Tubulina foram utilizados a fim de confirmar a possibilidade de amplificação dos cDNAs obtidos e determinar o melhor controle endógeno a ser utilizado nas análises quantitativas.

Tabela 4.2 – Reagentes utilizados nas reações de PCR convencional

Genes	H ₂ O	Tampão	Reagentes (μl)				cDNA
			MgCl ₂	DNTPs	Iniciadores	Enzima	
ASH2L	18	2,5	1,0	0,6	1,0	0,4	0,5
HHEX	19,25	2,5	0,75	0,6	0,5	0,4	0,5
HOXA7	18,6	2,5	0,75	0,6	0,5	0,5	1,0
PITX1	18,75	2,5	1,25	0,6	0,5	0,4	0,5
PKNOX1	15,2	2,5	2,5	1,0	1,2	0,4	1,0
TGIF	18,65	2,5	0,75	0,6	0,5	0,4	0,5
Constitutivos	19,5	2,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5

Tabela 4.3 – Condições de ciclagem das reações de PCR convencional, de acordo com o gene, a temperatura e o tempo otimizados

	ASH2L	HHEX	HOXA7	PITX1	PKNOX1	TGIF	Constitutivos
Denaturação inicial	94°C 3min	94°C 3min	94°C 3min	94°C 3min	94°C 3min	94°C 3min	94°C 3min
Denaturação	94°C 1min	94°C 1min	94°C 1min	94°C 1min	94°C 1min	94°C 1min	94°C 1m30s
Associação	58°C 50s	59°C 50s	65°C 50s	68°C 50s	67°C 50s	50°C 50s	58°C 1min
Extensão	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72° C 1m30s
No. ciclos	38	35	41	42	41	33	35
Extensão final	72°C 7min	72°C 7min	72°C 7min	72°C 7min	72°C 7min	72°C 7min	72°C 5min

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta em transiluminador. Todas as reações foram realizadas em duplicatas para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

4.6 PCR quantitativo

As análises quantitativas foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Genomas da Universidade do Vale do Paraíba, sob a supervisão do Prof. Dr Francisco Gorgônio da Nóbrega.

Para tal, a expressão dos transcritos dos genes ASH2L, HHEX, HOXA7, PITX1, PKNOX1 e TGIF foi analisada quantitativamente por meio do PCR quantitativo. Todas as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços específicas para PCR em tempo real, com os seguintes reagentes: 1 µl de iniciadores (Tabela 4.4) especificamente desenhados para esse fim (em concentrações entre 200 e 300 nM), 7,5 µl de Platinum SYBER Green qPCR SuperMix-UDG com ROX (Invitrogen), 5 µl de cDNA (na diluição de 1:50) e água destilada/esterilizada livre de DNase e RNase num volume final de 15 µl. A ciclagem térmica foi realizada seguindo o protocolo padrão do aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems): 50°C por 2 min (incubação do UDG), 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 68°C por 30 seg. Um ciclo final de 10 min a 72°C para a curva de dissociação foi realizado a fim de garantir as condições ótimas da reação e a confiabilidade dos resultados. Os dados foram normalizados com base na expressão do gene constitutivo HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) e analisados utilizando o método do ΔC_t . As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicatas para minimizar erros de pipetagem que são críticos para esse procedimento.

Tabela 4.4 – Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR quantitativo em relação ao gene, ao número de acesso no Gene Bank, ao sentido e ao tamanho do produto

Gene	No. acesso	Iniciadores 5' → 3'	Posição	Produto
ASH2L	NM_004674	Senso: ccgaaggatctcacttacgccc Anti-senso: gcgctcccatccacttctgtct	1760-1782 1870-1848	111 pb
HHEX	NM_002729	Senso: tcgacgcgctaaatggagga Anti-senso: gaggcaggggagggcgaaca	624-643 788-769	165 pb
PITX1	NM_002653	Senso: cgccgtgtggaccaacctca Anti-senso: ccggcggcggtacacgtcctc	759-778 925-907	167 pb
PKNOX	NM_004571	Senso: ggagagcctggaagcccgtg Anti-senso: cggcaccacaattccctgag	672-691 764-745	93 pb
TGIF	NM_170695	Senso: catccgctggctcaggca Anti-senso: gcggcgggctgtgatgaa	860-877 1030-1047	188 pb
HOXA7	NM_006896	Senso: ggcgctgcgacaagacggac Anti-senso: agcgcggttaggtctggcggc	427-447 550-530	124 pb
β-actina	NM_001101	Senso: cgacaggatgcagaaggag Anti-senso: tcctgcttgctgatccacat	1003-1021 1136-1155	153 pb
GAPDH	NM_002046	Senso: gcatcctgggctacactga Anti-senso: ccaccaccctgttgctgta	917-936 1059-1078	162 pb
HPRT	NM_000194	Senso: ttctttgctgacctgctgg Anti-senso: tccctgttgactggtcat	305-323 405-423	119 pb
Tubulina	NM_001069	Senso: ctggcaccatggactctg Anti-senso: tcggctccctctgtgtag	294-312 399-418	125 pb

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos para cada linhagem celular, foram comparados estatisticamente por meio da análise de variância ($p < 0.05$), usando o tratamento celular como fator de variação. Quando necessário, o teste de Tukey ($p < 0.05$) foi usado como teste “post hoc”. Nas múltiplas comparações realizadas com as diferenças entre médias e o valor crítico de Tukey, utilizou-se a influência do

tratamento sobre as células e a influência do tipo celular sobre o tratamento, ou seja, somente comparações verticais e horizontais.

5 RESULTADOS

Essa seção será descrita em subtítulos para facilitar o entendimento dos resultados obtidos durante todas as fases do presente estudo.

5.1 Curvas de crescimento celular

O índice de proliferação das linhagens celulares utilizadas neste estudo foi analisado nas diferentes condições experimentais (tratamento e ausência de tratamento). Após a realização das curvas de crescimento por um período de 48 h, foi possível verificar que as 3 linhagens celulares utilizadas (HN6, HN31 e HaCaT) apresentaram índices de proliferação diferentes. Conforme pode ser verificado na figura 5.1, a linhagem celular não-tumoral HaCaT apresentou o maior potencial proliferativo seguido da linhagem metastática HN31 e da linhagem de tumor primário HN6.

De um modo geral, quando as células foram tratadas com EGF ou TGF- β 1 verificou-se que os dois tratamentos foram capazes de estimular o crescimento de quase todas as linhagens celulares utilizadas (Figura 5.2). Individualmente, o EGF foi capaz de induzir a proliferação das linhagens celulares tumorais e mostrou um discreto decréscimo na proliferação da célula não-tumoral HaCaT. Ao contrário do que foi observado nas linhagens sem tratamento, o EGF mudou o potencial de proliferação das células tornando a HN6 a linhagem mais proliferativa, seguida pela

HN-31 e por fim pela HaCaT. Já o TGF- β 1 induziu a proliferação das 3 linhagens celulares frente ao controle (ausência de tratamento) e manteve a linhagem não-tumoral HaCaT como a mais proliferativa, seguida da HN-31 e por fim pela HN6, conforme verificado nas células sem tratamento. Comparativamente, o TGF- β 1 induziu maior proliferação de todas as células analisadas frente ao EGF.

Figura 5.1 – Gráfico da curva de crescimento das células sem tratamento

Figura 5.2 – Gráfico da curva de crescimento das células tratadas com EGF e TGF- β 1. Os dados foram normalizados com a curva de crescimento das células sem tratamento que foram consideradas 100% (representadas pela linha preta)

5.2 Determinação do gene constitutivo

O gene constitutivo a ser utilizado como controle endógeno das análises quantitativas por PCR em tempo real foi escolhido por meio da comparação entre 4 genes sugeridos e amplamente utilizados na literatura. Os genes avaliados foram β -actina, GAPDH, HPRT e Tubulina. A amplificação dos 4 genes constitutivos é verificada na figura 5.3.

Figura 5.3 – Gel de agarose 2%, exemplificando a amplificação por PCR convencional dos 4 genes constitutivos nas linhagens estudadas. Onde A= β -actina; B= GAPDH; C= HPRT; D= Tubulina

Os resultados obtidos por meio da amplificação por PCR foram analisados, semi-quantitativamente, através do software AlphaDigDoc (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) por meio da quantificação das bandas obtidas em gel de agarose 2% (Figura 5.4).

Figura 5.4 – Gel de agarose 2%, exemplificando a análise semi-quantitativa realizada com o programa AlphaDigDoc. Onde 1= 60ng; 2= 40ng; 3= 20ng

Os resultados mostraram que os genes HPRT e Tubulina apresentaram uma menor taxa de variação entre as linhagens avaliadas independente da condição experimental (tratamento ou ausência do tratamento). Já os genes β -actina e GAPDH mostraram grande variação entre as linhagens estudadas e frente aos tratamentos utilizados. Esses achados foram analisados estatisticamente e podem ser observados na Figura 5.5.

Figura 5.5 – Gráfico evidenciando a variação dos 4 genes constitutivos analisados

Individualmente, a β -actina mostrou maior expressão nas linhagens tratadas com TGF- β 1 frente às tratadas com EGF (Figura 5.6). O oposto ocorreu com o GAPDH no qual houve maior expressão nas linhagens tratadas com EGF e expressão diminuída nas linhagens tratadas com TGF- β 1 quando comparadas ao controle (ausência de tratamento) (Figura 5.7). O HPRT apresentou maior expressão nas linhagens tratadas com EGF, enquanto que a Tubulina mostrou maior expressão nas células não tratadas (Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente).

De um modo geral, quanto ao nível de expressão, o menor deles foi apresentado pela Tubulina, seguido pelo HPRT, GAPDH e β -actina.

Figura 5.6 – Gráfico representando a expressão do gene constitutivo β -actina nas 3 linhagens tratadas e não tratadas

Figura 5.7 – Gráfico representando a expressão do gene constitutivo GAPDH nas 3 linhagens tratadas e não tratadas

Figura 5.8 – Gráfico representando a expressão do gene constitutivo HPRT nas 3 linhagens tratadas e não tratadas

Figura 5.9 – Gráfico representando a expressão do gene constitutivo Tubulina nas 3 linhagens tratadas e não tratadas

5.3 Amplificação por PCR convencional dos seis genes homeobox estudados

Uma amplificação por PCR convencional foi realizada para verificação da presença dos transcritos dos 6 genes homeobox avaliados nesse estudo. Como resultados, todos os 6 genes mostraram amplificação positiva atestando estarem

presentes nas linhagens analisadas. A partir desses resultados deu-se prosseguimento às análises quantitativas por PCR em tempo real. Esses dados podem ser verificados na figura 5.10.

Figura 5.10 – Gel de agarose 2%, exemplificando a amplificação por PCR convencional dos 6 genes homeobox nas linhagens estudadas. Onde, Std= Padrão molecular; A= ASH2L; B= HHX; C= HOXA7; D= PITX1; E= PKNOX1; F= TGIF

5.4. Análise quantitativa da expressão dos transcritos dos seis homeobox estudados

Os resultados encontrados pela análise de quantificação relativa da expressão dos 6 genes homeobox estudados em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca estimuladas ou não com EGF e TGF- β 1 são apresentados em 6 gráficos. Esses dados foram normalizados pelo gene HPRT, e a linhagem não tumoral HaCaT (sem tratamento) foi utilizada como calibrador universal para o estabelecimento de comparações com as demais linhagens e tratamentos. Os

resultados serão apresentados gene a gene de acordo com a interpretação da análise estatística de cada um (ANEXO B).

5.4.1 ASH2L

Embora graficamente, o tratamento com EGF tenha aumentado a expressão de ASH2L na linhagem metastática HN31 e na linhagem não-tumoral HaCaT, e o TGF- β 1 tenha sido capaz de aumentar a expressão de ASH2L em ambas as linhagens tumorais e diminuí-la na HaCaT (figura 5.11), diferenças estatísticas não foram observadas (ANEXO B).

Figura 5.11 – Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene ASH2L nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1

5.4.2 HHEX

Após análise estatística (ANEXO B), e conforme pode ser verificado na figura 5.12, a linhagem tumoral HN6 teve a expressão significativamente aumentada quando tratada com TGF- β 1 (representada pelas letras a, b na figura 5.12). Já a linhagem tumoral HN31 mostrou expressão alterada quando comparados os tratamentos com EGF e TGF- β 1. Também nesse caso, o tratamento com TGF- β 1 foi capaz de aumentar a expressão de HN31 frente ao tratamento com EGF (A, B).

Figura 5.12 – Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene HHEX nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento em cada linhagem celular (Letras minúsculas = HN6; Letras maiúsculas = HN31)

5.4.3 HOXA7

Conforme pode ser verificado na figura 5.13, em relação à expressão de HOXA7, a linhagem HN6 não-tratada (controle) foi estatisticamente diferente da HN31 controle (a, b) enquanto que a mesma diferença foi encontrada entre a linhagem HN6 e HN31 tratadas com TGF- β 1 (A, B). Em ambos os casos, a linhagem tumoral metastática HN31 apresentou maior expressão do transcrito do gene HOXA7.

Figura 5.13 – Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene HOXA7 nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tipo celular em cada tratamento (Letras minúsculas = Controle; Letras maiúsculas = TGF- β 1)

5.4.4 PKNOX1

No caso dos transcritos do gene PKNOX1, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas apenas entre a linhagem tumoral HN6 controle e a HN6 tratada com TGF- β 1 (a, b). Como pode ser observado na figura 5.14, o tratamento com TGF- β 1 foi capaz de aumentar significativamente a expressão do transcrito do gene PKNOX1 na linhagem HN6.

Figura 5.14 – Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene PKNOX1 nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento na linhagem HN6

5.4.5 TGIF

Individualmente, o TGF- β 1 foi capaz de aumentar a expressão de TGIF na linhagem tumoral HN6 quando comparada a HN6 não tratada (controle), como é mostrado na figura 5.15 pelas letras a, b. Adicionalmente, TGF- β 1 também

aumentou a expressão dos transcritos do gene TGIF nas linhagens tumorais HN6 e HN31 quando comparadas à linhagem não-tumoral HaCaT (indicado pelo símbolo *). Conversamente, o tratamento com EGF diminuiu a expressão de TGIF em ambas as linhagens tumorais, porém esses dados não foram estatisticamente significantes. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas em relação aos tratamentos utilizados e também quanto às comparações entre as células. Esses dados podem ser verificados na figura 5.15.

Figura 5.15 – Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene TGIF nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF-β1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento na linhagem HN6. O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tipo celular no tratamento com TGF-β1

5.4.6 PITX1

O mesmo resultado descrito para o gene TGIF foi observado quando a expressão do gene PITX1 foi analisada. Assim, o TGF- β 1 aumentou a expressão de PITX1 na linhagem tumoral HN6 comparada com a HN6 controle (a, b), e nas linhagens tumorais (HN6 e HN31) frente à HaCaT (símbolo *). Além desses dados, o TGF- β 1 também aumentou a expressão dos transcritos desse gene na linhagem metastática HN31 quando comparada à HN31 não tratada (A, B). Assim como no caso do gene TGIF, quando tratadas com EGF as linhagens tumorais apresentaram expressão diminuída de PITX1, porém esses dados não foram estatisticamente significantes. Diferenças estatisticamente significantes também foram encontradas quando os tratamentos foram comparados mostrando que a linhagem não-tumoral (HaCaT) tratada com EGF, apresentou maior expressão de PITX1 frente à HaCaT tratada com TGF- β 1 (Ω , Δ). Esses dados podem ser verificados na figura 5.16.

Figura 5.16 – Gráfico representando a expressão, por PCR quantitativo, do gene PITX nas linhagens tratadas e não-tratadas com EGF e TGF- β 1. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tratamento em cada linhagem celular (Letras minúsculas = HN6; Letras maiúsculas = HN31; Letras gregas = HaCat). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes na análise da influência do tipo celular no tratamento com TGF- β 1.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo estabeleceu, pela primeira vez, que o estímulo de duas vias de sinalização (EGF e do TGF- β) em linhagens de células de carcinoma epidermóide modifica a expressão de transcritos de genes homeobox. Este dado acrescenta informação nova ao que se sabe sobre essas vias, e abre caminho para a compreensão da participação dos genes homeobox na carcinogênese de boca.

6.1 O carcinoma epidermóide, novos marcadores prognósticos e alvos terapêuticos

O carcinoma epidermóide de boca é uma lesão agressiva que além de comprometer a qualidade de vida dos pacientes por ele acometido, apresenta alto índice de mortalidade (SLOOTWEG; EVESON, 2005; MASSANO et al., 2006).

Por isso, muitos genes envolvidos na biologia do tumor têm sido caracterizados, e, contínuas pesquisas têm focado na identificação de novos alvos moleculares. Na medida em que novos candidatos são validados, modelos de progressão tumoral são redefinidos e melhorados. Com o aumento da descoberta de informações a respeito do câncer, pode ser possível, no futuro, prever seu comportamento biológico e lançar mão de terapias mais específicas e eficientes (KIM; CALIFANO, 2004). Embora alguns potenciais marcadores estejam sendo sugeridos para carcinomas epidermóide de cabeça e pescoço, até o momento

nenhum consenso a respeito de alterações moleculares que promovam melhores informações ao prognóstico foi alcançado (CHIESA et al., 1999; HELLIWELL, 2001; QUON; LIU; CUMMINGS, 2001; LOPES et al., 2002).

Adicionalmente, estudos têm demonstrado que os padrões das alterações genéticas podem ser usados para prever o comportamento biológico e o potencial tumorigênico de lesões pré-malignas de cabeça e pescoço (KIM; CALIFANO, 2004). Além disso, uma vez que as proteínas de sinalização são mais afetadas no câncer do que os fatores de transcrição, esses últimos têm sido sugeridos como marcadores prognósticos e como alvo de terapias (DARNELL JR, 2002). Esse fato sugere um novo e importante papel aos genes homeobox: potenciais marcadores de prognóstico e alvos de terapias uma vez que, sabidamente, eles codificam proteínas que funcionam como fatores de transcrição regulando vários eventos celulares (ABATE-SHEN, 2002).

Nesse contexto, nossos resultados sugerem que os genes PITX1 e TGIF sejam mais profundamente estudados uma vez que ambos mostraram expressão aumentada de seus transcritos nas linhagens tumorais frente à linhagem não-tumoral e podem representar, no futuro, importantes alvos terapêuticos e marcadores de prognóstico para o carcinoma epidermóide de boca.

6.2 O PCR quantitativo e a escolha do melhor gene constitutivo a ser utilizado

Ao contrário de uma reação de PCR convencional que visa a amplificação final de um produto alvo, a reação de PCR em tempo real objetiva mensurar a quantidade de DNA/RNA inicial. Essa última baseia-se no chamado Ct (“threshold

cycle”) que é o ciclo no qual o sinal de amplificação exponencial alcança intensidade fluorescente superior ao limiar de detecção sendo assim captado em tempo real. Assume-se que quanto menor o Ct, maior é a expressão (ou quantidade) de determinado alvo seja ele um gene, uma bactéria ou um vírus, por exemplo. No presente estudo, procuramos quantificar a expressão dos transcritos de 6 genes homeobox de interesse e para tal utilizamos o sistema de detecção SYBR Green. Este sistema, intercala-se com a dupla fita de DNA (do mesmo modo que o brometo de etídio) e com seus produtos durante os ciclos da PCR emitindo uma fluorescência que é captada e transformada em valor numérico por meio do Ct. Embora esse sistema apresente menor especificidade frente ao sistema de sondas, seu custo reduzido e sua confiabilidade levaram-nos a utilizá-lo em nosso estudo. Nossa análise baseou-se numa quantificação relativa na qual se realiza uma comparação do ácido nucléico alvo com a do calibrador. Nesse ponto, é importante ressaltar a diferença entre os conceitos normalizador e calibrador. O calibrador é uma AMOSTRA com a qual todas as demais serão comparadas e não o gene alvo. Em nosso estudo, utilizamos a amostra HaCaT não estimulada como um “calibrador universal” pois ela representa o nosso controle tanto em relação às linhagens tumorais quanto aos tratamentos realizados. Já o controle interno (gene constitutivo ou normalizador) deve ser constante, pois por meio dele qualquer erro de pipetagem, diferenças na qualidade das extrações e diferenças nas amostras podem ser verificadas. Ele, portanto, serve de “referência basal” da amplificação do alvo devendo ser estabelecido em função da amostra utilizada e considerando a expressão do alvo a ser estudado.

Nesse contexto, a escolha do melhor gene constitutivo a ser utilizado tem sido motivo de constantes discussões na literatura, e, embora muitos esforços estejam

sendo empenhados nesse sentido, um consenso ainda não foi alcançado. Portanto, é importante que uma avaliação seja realizada para a seleção do melhor gene constitutivo frente à amostra utilizada uma vez que toda a análise da expressão gênica pode ser prejudicada pela utilização de um controle endógeno inadequado (RODRIGUEZ-CANALES, et al., 2007). Esse “gene referência” (ou também chamado “housekeeping”, controle endógeno ou gene constitutivo) fará o importante papel de normalizador de uma reação de PCR em tempo real (quantificação relativa). Assim sua adequação à amostra e ao alvo deve ser realizada uma vez que com ela busca-se determinar a referência mais estável em qualquer situação.

Diante desse cenário, buscamos verificar o controle endógeno mais adequado para o presente estudo. De acordo com os resultados da análise de 4 genes constitutivos (β -actina, GAPDH, HPRT e Tubulina) nas amostras utilizadas no presente estudo, os genes HPRT e Tubulina mostraram-se os mais adequados. Primeiro porque ambos apresentaram baixa expressão, se assemelhando com as também baixas expressões dos genes-alvo de nosso estudo (Figuras 5.8 e 5.9); segundo porque foram esses dois genes aqueles que apresentaram a menor taxa de variação dentre as linhagens e os tratamentos utilizados (Figura 5.5). Já os genes β -actina e GAPDH, mostraram-se pouco estáveis nas diferentes amostras e tratamentos (Figura 5.5) bem como apresentaram alta expressão o que poderia comprometer os dados comparativos em relação aos genes homeobox que apresentam baixa expressão (Figuras 5.6 e 5.7). Desse modo, baseados nos bons resultados apresentados pelo gene HPRT em relação à amostra utilizada no presente estudo, e, uma vez que ele vem sendo utilizado como gene constitutivo em estudos envolvendo amostras provenientes de carcinomas (OKAMOTO et al., 2007) optamos por elegê-lo como o normalizador de nossas análises quantitativas.

6.3 A importância do estudo dos genes homeobox e a escolha dos genes aqui avaliados

A literatura tem relatado, de forma crescente, o estudo dos genes homeobox relacionando-os à embriogênese e mais recentemente à carcinogênese (SAMUEL; NAORA, 2005). De um modo filosófico, ambos os processos – embriogênese e carcinogênese – podem ser entendidos como “lados diferentes da mesma moeda”. Primeiro porque compartilham eventos como diferenciação e proliferação celular e parecem ser orquestrados por uma complexa interação entre genes e vias de sinalização que entram e saem de cena numa lógica ainda não compreendida ou reproduzida totalmente; segundo porque contemplam de um lado o equilíbrio entre os processos de proliferação, diferenciação e morte celular, enquanto que de outro lado convivem com o desequilíbrio dos mesmos (NUNES et al., 2003). Nesse sentido, os genes homeobox são muito importantes durante diversas fases do desenvolvimento embrionário. Não obstante, qualquer instabilidade ou descontrole durante o processo de embriogênese pode desencadear uma série de erros que culminariam, por exemplo, na formação errada de um órgão ou tecido, ou até mesmo levaria a eventos letais ao organismo. Portanto, genes envolvidos na embriogênese exercem um importante papel no controle de processos como diferenciação e proliferação celular, e devem ser considerados reguladores-chave dos mecanismos que envolvem esses processos. No câncer, pode-se supor que haja também um mecanismo regulatório que desencadeie os eventos necessários ao seu estabelecimento, manutenção e progressão. Pode ser que o organismo não entenda que está “desenvolvendo” uma massa tumoral que irá consumir toda a

energia de um organismo e levá-lo à morte. Ao contrário, assim como na embriogênese, o organismo, os genes e demais componentes responsáveis pelo equilibrado processo de formação de órgão e tecidos podem entender que todos esses eventos são necessários levando ao desenvolvimento de uma neoplasia. Por esse motivo o estudo de genes que estejam envolvidos com processos que representem “os dois lados de uma mesma moeda” se torna uma linha promissora e elucidativa, pois assim como na embriogênese os eventos aconteceriam como uma cascata e mapeá-los talvez ofereça respostas interessantes.

Diante desse cenário, o presente estudo se propôs a avaliar 6 genes (ASH2L, HHEX, HOXA7, PITX1, PKNOX1 e TGIF) dentro de um universo de mais de duzentos genes homeobox. A escolha desses seis candidatos aconteceu por meio de uma identificação prévia dos mesmos, realizada no Projeto Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço (2001). Nessa oportunidade, transcritos desses genes apresentaram-se com baixa expressão, porém mereceram nossa atenção e iniciaram uma linha de pesquisa no Laboratório de Patologia Molecular relacionando-os ao carcinoma epidermóide de boca (CAZAL, 2004; LIBÓRIO, 2004; MATIZONKAS-ANTONIO, 2005). Nesses estudos prévios realizados em nosso laboratório, características clínicas foram associadas aos achados histológicos e de hibridização *in situ* em carcinomas epidermóides de boca e em tecidos não-tumorais adjacentes. Mais especificamente, o presente estudo, foi planejado com o objetivo de aprofundar as análises realizadas em tecidos e utilizou linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca primário e metastático comparando seus dados com àqueles encontrados em célula não-tumoral. Esse modelo de cultura de células foi eleito por apresentar a plasticidade necessária para o estudo mais profundo dos mecanismos de interação de genes com vias de sinalização. Para tal, a escolha das

vias do EGF e do TGF- β mostrou-se bastante interessante e não ocorreu por acaso, uma vez que ambas estão sabidamente envolvidas com supressão e progressão de carcinomas de boca (LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001; BIERIE; MOSES, 2006; YEUDALL et al., 2005). Desse modo nosso estudo estabeleceu, pela primeira vez, uma relação entre os genes homeobox, o carcinoma epidemóide de boca e duas vias de sinalização (EGF e do TGF- β) envolvidas na carcinogênese oral. Assim, esse estudo não só traça o perfil de expressão dos genes homeobox estudados como também o relaciona às vias de sinalização que são ativadas pelos fatores utilizados. Baseados em nossos resultados, podemos sugerir que alguns dos genes estudados estão mais diretamente relacionados ao carcinoma epidermóide de boca. Abrimos, ainda, perspectivas à realização de estudos funcionais que envolvam a verificação das proteínas, o silenciamento e a superexpressão de genes, e o potencial migratório e invasivo das linhagens mediante aos estímulos recebidos.

6.4 O EGF, o TGF- β 1 e a comparação tumor primário versus metastático: esses fatores interferiram na expressão dos genes homeobox?

Uma vez que as linhagens celulares utilizadas no presente estudo contemplavam diferentes situações (carcinoma primário, metastático e não-tumoral), uma análise de suas características proliferativas foi realizada. Por meio desta avaliação, foi possível verificar que em nível basal (ausência de tratamento), a linhagem HaCaT foi aquela que apresentou maior potencial proliferativo seguida da HN31 e da HN6. Ambos os tratamentos realizados (EGF e TGF- β 1) foram capazes de induzir o aumento da taxa de proliferação das linhagens fato que também é

descrito na literatura (LA CELLE; POLAKOWSKA, 2001; YEUDALL et al., 2005). Particularmente, o aumento da taxa de proliferação observado na linhagem HN6 estimulada com EGF pode ser justificado pelo fato dessa linhagem apresentar o EGF constitutivamente ativado (CARDINALI et al, 2005). Assim uma maior ativação do EGFR denota também aumento na proliferação.

A seguir, os transcritos dos seis genes homeobox estudados foram amplificados e se mostraram presentes em todas as linhagens celulares utilizadas e em ambos os tratamentos propostos. Quando comparadas, as células de tumor primário (HN6) e metastático (HN31) mostraram algumas diferenças estatisticamente significantes em relação ao gene HOXA7 (Figura 5.14). Esses achados sugerem que há diferenças entre os dois processos – estabelecimento do tumor e sua progressão – e que ocorram diferentes participações desse gene em cada etapa do processo tumoral. Outro fator observado foi a menor expressão dos 6 genes homeobox aqui estudados, nas linhagens controle (não-tratadas) frente às linhagens estimuladas o que sugere a interação desses genes com as vias de sinalização estimuladas pelo EGF e TGF- β 1. Ainda no estado basal (ausência de tratamento), a célula não-tumoral (HaCaT) mostrou um maior perfil de expressão dos genes homeobox estudados frente às linhagens tumorais o que sugere que a perda de função seja mesmo um evento relacionado ao estabelecimento e progressão tumoral (MIYAZAKI et al., 2006). Esse dado também suporta a hipótese, á relatada na literatura, de que uma sucessão de perdas e ganhos de função dos genes homeobox poderia influenciar no processo da carcinogênese (ABATE-SHEN, 2002).

De acordo com a literatura, o TGF- β é um supressor de tumor que age bloqueando o crescimento de muitos tipos celulares (MASSAGUÉ; BLAIN; LO, 2000; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001; BIERIE; MOSES, 2006) e que tem sido proposto

como alvo de terapias câncer-específicas (BIERIE; MOSES, 2006). Já o EGF tem sido relacionado ao câncer bucal estando expresso em mais de 90% dos processos de carcinogênese e invasão tecidual (GRANDIS; TWEARDY, 1993). Além disso, é sabido que as homeoproteínas agem ativando ou reprimindo a ação de fatores de crescimento (FORD, 1998; CILLO et al., 1999). Desse modo, tentando entender o funcionamento dessas vias de sinalização bem como suas interações com os genes homeobox, estimulamos células tumorais (carcinoma epidermóide primário e metastático) e não tumorais com TGF- β 1 e EGF. Conforme demonstrado em estudo prévio (SALLES, 2005), por imunofluorescência, todas as células utilizadas exibiram a presença dos receptores para EGF e TGF- β , o que tornou possível obter respostas aos estímulos realizados no presente estudo.

Embora não tenham sido observados resultados estatisticamente significantes, o tratamento com EGF induziu, graficamente, uma maior expressão dos genes homeobox estudados na linhagem não tumoral (HaCaT) frente às linhagens tumorais. Já a descrita estimulação do gene HOXA7 via EGF (LA CELLE; POLAKOWSKA, 2001), só foi verificada na linhagem HaCaT, embora, novamente esses dados não tenham sido estatisticamente significantes. Particularmente, os transcritos dos genes PITX1 e TGIF mostraram decréscimo na expressão de seus transcritos em ambas as linhagens tumorais após estímulo com EGF. Esses achados também suportam o fato de que perdas de função gênica podem representar o primeiro evento na transformação maligna e na progressão tumoral (MIYAZAKI et al., 2006), e isso estaria sendo verificado no caso desses dois genes homeobox. Por outro lado, a baixa expressão dos transcritos desses genes nas linhagens tumorais tratadas com EGF pode sugerir uma interação regulatória dos genes homeobox com essa via de sinalização. Isso pode ser justificado pelo

conhecimento de que o acoplamento dos ligantes de EGFR (como é o exemplo do EGF), estimula a dimerização desse receptor e ativa sua participação no controle celular normal e no tumor. Assim, é possível sugerir que a baixa expressão desses dois genes homeobox (PITX1 e TGIF) em linhagens tumorais estimuladas pelo ligante EGF signifique uma regulação negativa dessa via de sinalização ou, ainda, uma regulação negativa da via do EGF sobre esses fatores de transcrição. Porém, esses dados devem ser observados com cautela, e comprovados por meio de estudos funcionais.

De um modo geral, o TGF- β 1 foi capaz de induzir, significativamente, o aumento da expressão dos transcritos de 5 genes homeobox estudados nas linhagens tumorais (HN6 e HN31), exceto o gene ASH2L que não mostrou diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das comparações realizadas. Porém, os dados mais expressivos foram encontrados na análise dos transcritos dos genes TGIF e PITX1 (Figuras 5.15 e 5.16, respectivamente).

Nossos resultados mostraram que dentre os genes homeobox estudados, a expressão de transcritos dos genes TGIF e PITX1 foi significativamente aumentada nas linhagens celulares tumorais quando estimuladas com TGF- β 1. Para explicar parte desses resultados sugerimos uma hipótese baseada em dados previamente descritos na literatura. É sabido que as proteínas Smad são mediadoras centrais do TGF- β que são translocadas ao núcleo após a fosforilação via receptor de TGF- β (MASSAGUÉ; BLAIN; LO, 2000; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001). Uma vez no núcleo, complexos da Smad ativada são recrutados pelo DNA, e, unido a ele, formam o complexo de transcrição Smad-DNA que interage com co-ativadores permitindo a transcrição do mesmo. Porém, no núcleo, as atividades transcricionais dos complexos de Smad podem ser moduladas pelo TGIF, que nesse processo age

como um co-repressor. Aumentos nos níveis de expressão do co-repressor TGIF inibem a transcrição da Smad ativada e diminuem a resposta anti-proliferativa TGF-dependente levando à progressão do tumor (WOTTON et al., 1999; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001). Esses dados foram estabelecidos pela literatura utilizando a linhagem celular de queratinócitos imortalizados HaCaT (GOSSEN; BUJARD, 1992), também utilizada como linhagem controle (não-tumoral) no presente estudo. Posteriormente, novos estudos usaram a superexpressão de TGIF para demonstrar o aumento da resistência à inibição de crescimento mediada pelo TGF- β (LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001). Isso indica o envolvimento do repressor transcricional TGIF em antagonismo com a resposta anti-proliferativa TGF- β -dependente e aponta para a importância da regulação dos níveis de expressão desse gene. Desse modo, ao verificarmos a expressão elevada do gene TGIF somente em nossas linhagens tumorais (HN6 e HN31) estimuladas com TGF- β 1 frente às não-tratadas, podemos correlacionar nossos achados aos da literatura e sugerir que esse gene esteja ligado à carcinogênese do carcinoma epidermóide de boca. Uma vez que as linhagens tumorais utilizadas no presente estudo exibem potenciais de proliferação diferentes e são provenientes de tumor primário e de metástase de carcinomas epidermóides é possível sugerir que o gene TGIF esteja relacionado ao estabelecimento e progressão do carcinoma epidermóide de boca via inibição da resposta anti-proliferativa TGF- β -dependente. Por outro lado, pode ser que o estímulo de proliferação celular ocasionado pelo TGF- β 1 tenha desencadeado uma resposta de feedback negativo com a proteína reguladora aumentando a expressão de TGIF somente para controlar o excesso do fator de estímulo.

Do mesmo modo, os resultados verificados em relação à expressão do gene PITX1 mostraram-se semelhantes àqueles encontrados para o gene TGIF. Embora o

gene PITX1 esteja sendo considerado um supressor de tumor devido à sua perda de expressão em tumores de pulmão (CHEN et al., 2007), e uma relação desse gene com a via de sinalização do TGF- β ainda não tenha sido descrita, sugerimos que, assim como o TGIF, ele funcione também como um co-repressor dos complexos Smad inibindo a resposta anti-proliferativa TGF- β -dependente e levando a progressão tumoral. Adicionalmente, a regulação negativa da via do Ras por meio do PITX1, já demonstrada na literatura (KOLFSCHOTEN et al., 2005), leva-nos a sugerir que também haja uma interação desse gene com a via do TGF- β . Porém, estudos funcionais devem ser realizados para a verificação dos mecanismos que levam a essa interação.

Baseados em nossos achados e uma vez que os genes homeobox são conhecidos como reguladores transcricionais de processos celulares-chave e são associados com diferenciação e com carcinogênese, podemos sugerir que o PITX1 e o TGIF estejam ligados com o desenvolvimento e progressão do carcinoma epidermóide de boca via TGF- β . Adicionalmente, a suposta regulação negativa da via do EGF por meio da ação dos genes PITX1 e TGIF pode conferir um novo e importante mecanismo regulatório nessa neoplasia.

6.5 Perspectivas Futuras

Atualmente, é comum afirmar que as células do câncer apresentam diferentes padrões transcricionais quando comparadas com as células normais que as originaram. Muitos estudos buscam o melhor entendimento dos mecanismos que

estabelecem o câncer por meio da análise de genes que serão ativados transcritionalmente e, propõem sua inibição como uma possível maneira de regular os processos tumorais. As interações entre os fatores de transcrição e os co-ativadores e co-repressores do maquinário transcrricional oferecem grandes possibilidades para intervenções farmacológicas.

No presente trabalho, nós demonstramos que o EGF e o TGF- β afetam de formas diferentes a expressão dos homeobox estudados em carcinomas epidermóides primário e metastático, corroboram dados descritos na literatura (MIYAZAKI et al., 2006). Particularmente os genes PITX1 e TGIF, interagem com a via de sinalização do TGF- β levando à progressão tumoral, possivelmente atuando como oncogenes, uma vez que, ambos apresentaram expressão aumentada nas células tumorais, primária e metastática, frente à célula não-tumoral quando tratadas com TGF- β 1. Essa hipótese baseia-se nos achados desse estudo e também na literatura (MASSAGUÉ; BLAIN; LO, 2000; LO; WOTTON; MASSAGUÉ, 2001) e é esquematizada na figura 6.1.

Figura 6.1 – Esquema ilustrando a hipótese da interação do TGIF com a via de sinalização do TGF- β 1

Adicionalmente, baseados na diminuição da expressão dos transcritos dos genes PITX1 e TGIF nas linhagens tumorais sob o efeito de EGF, sugerimos uma ação regulatória desses genes sobre a via de sinalização do EGF, ou dessa via sobre os dois genes. Isso deve ser confirmado e melhor explorado em estudos funcionais que promovam o bloqueio do receptor de EGF pela ação dos genes homeobox seguido da observação de uma possível “parada” do tumor pela indução da apoptose das células tumorais. Além disso, a verificação da expressão do EGFR nas linhagens estudadas também é um dado importante para fechar a hipótese aqui sugerida. Desse modo, aliados aos dados já consagrados da ação do EGF nos carcinomas epidermóides de boca, a participação dos genes homeobox interagindo com essa via pode indicar, no futuro, novas modalidades de terapias contra essa neoplasia.

De um modo geral, a presença dos 6 homeobox estudados em células tumorais e em linhagem não-tumoral sugere que estes estejam ligados à manutenção da estrutura celular desses dois fenótipos. Porém, a maior expressão, particularmente dos genes PITX1 e TGIF, aponta para uma possível e importante associação desses genes com o estabelecimento e a progressão do CEB.

Finalmente, estudos funcionais e a investigação aprofundada dos genes PITX1 e TGIF como candidatos à inibição da transformação maligna em cultura de células são fortemente sugeridos como perspectivas futuras. Aliados aos fatores EGF e TGF- β , os genes homeobox podem emergir como potenciais marcadores e alvos de terapias contra esse tipo de neoplasia.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos achados do presente estudo foi possível concluir que:

7.1 O perfil de expressão dos 6 genes homeobox (ASH2L, HHEX, HOXA7 PKNOX1, PITX1, TGIF) em células de carcinoma epidermóide primário e metastático e em células não-tumoral mostrou-se variável em relação às linhagens celulares e aos tratamentos utilizados (EGF e TGF- β);

7.2 Em geral, a ausência de tratamento mostrou maior expressão dos transcritos de todos os 6 genes homeobox na linhagem não-tumoral (HaCaT) frente às duas linhagens tumorais (HN6 e HN31), sugerindo que esses genes participem da manutenção estrutural desse fenótipo;

7.3 O tratamento com EGF estimulou a expressão dos transcritos dos genes ASH2L, HHEX, HOXA7 e PKNOX1 na linhagem não-tumoral (HaCaT) enquanto que diminuiu a expressão dos transcritos dos genes PITX1 e TGIF em ambas as linhagens tumorais (HN6 e HN31);

7.4 De um modo geral, o TGF- β 1 foi capaz de aumentar a expressão de todos os transcritos dos genes estudados nas linhagens tumorais (HN6 e HN31) frente à linhagem não-tumoral (HaCaT), sendo , particularmente significativa para os transcritos dos genes PITX1 e TGIF;

7.5 Sugerimos que os genes PITX1 e o TGIF funcionem como oncogenes e estejam ligados com o desenvolvimento e progressão do carcinoma epidermóide de boca via TGF- β ;

7.6 Adicionalmente, sugerimos uma regulação negativa da via do EGF por meio da ação dos genes PITX1 e TGIF fato que pode conferir um novo mecanismo regulatório importante no carcinoma epidermóide cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS¹

Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature Reviews* 2002;2(10):777-85.

Afonja O, Smith JE Jr, Cheng DM, Goldenberg AS, Amorosi E, Shimamoto T, et al. MEIS1 and HOXA7 genes in human acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2000;24(10):849-55.

Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer – a double-edged sword. Trends Cell Biol 2001;11(11):S44-51

Bedford FK, Ashworth A, Enver T, Wiedemann LM. HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Res* 1993;21(5):1245-9.

Berthelsen J, Viggiano L, Schulz H, Ferretti E, Consalez GG; Rocchi M, Blasi F. PKNOX1, a gene encoding PREP1, a new regulator of Pbx activity, maps on human chromosome 21q22.3 and murine chromosome 17B/C. *Genomics* 1998;47(2):323-4.

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.

Bierie B, Moses HL. TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(7): 506-20.

Bijl JJ, van Oostveen JWV, Walboomers JM, Horstman A, van den Brule AJ, Willenze R, Meijer CJ. HOXC4, HOXC5 and HOXC6 expression in non-hodgkin's lymphoma: Preferential expression of HOXC5 gene in primary cutaneous anaplastic T-cell and oro-gastrointestinal tract mucosa-associated B-cell lymphomas. *Blood* 1997;90(10):4116-25.

Bridge CB, Morgan TH. The third chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst Wash* 1923;327:93.

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

Boncinelli E, Mallamaci A, Lavorgna G. Vertebrate homeobox genes. *Genetica* 1994;94(2-3):127-40.

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.

Boyle P, Zheng T, Macfarlane GJ, McGinn R, Maisonneuve P, LaVecchia C, Scully C. Recent advances in the etiology and epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1990;2(3):539-45.

Bürglin, TR. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* 1997;25(21): 4173–80.

Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int J Cancer* 1995;61(1):98-103.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979;48:193-216.

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

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(3):749-52.

Chao SH, Walker JR, Chanda SK, Gray NS, Caldwell JS. Identification of homeodomain proteins, PBX1 and PREP1, involved in the transcription of murine leukemia virus. *Mol Cell Biol* 2003;23(3):831-41.

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(Pt2):257-63.

Chen H, Rossier C, Nakamura Y, Lynn A, Chakravarti A, Antonarakis SE. Cloning of a novel homeobox-containing gene, PKNOX1, and mapping to human chromosome 21q22.3. *Genomics* 1997;41(2):193-200.

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

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

Chiesa F, Mauri S, Tradati N, Calabrese L, Giuliano G, Ansarin M et al. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. *Oral Oncol* 1999;35(6):590-6.

Chinoy MR, Volpe MV, Cilley RE, Zgleszewski SE, Vosatka RJ, Martin A et al. Growth factors and dexamethasone regulate Hoxb5 protein in cultured murine fetal lungs. *Am J Physiol* 1998;274(4 Pt 1):L610-20.

Ciardello F, Tortora G. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: Biological significance and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 1998;4(4): 821-8.

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

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

Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer* 1992;51(6):892-7.

Cotran RS, Kumar V, Robbins ST. *Patologia estrutural e funcional*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. cap.8, p. 233-95.

Crawford MJ, Lanctot C, Tremblay JJ, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, et al. Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mammalian Genome* 1997;8(11):841-5.

Darnell Jr JE. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2002;2(10):740-9.

- Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Rarnaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993;11(10):1873-8.
- D'Elia AV, Tell G, Russo D, Arturi F, Puglisi F, Manfioletti G, et al. Expression and localization of the homeodomain-containing protein HEX in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1376-83.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 2003;425(6958):577-84.
- De Vita G, Barba P, Odartchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G, et al. Expression of homeobox containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1993;29A(6):887-93.
- Dickson RB, Johnson MD, el-Ashry D, Shi YE, Bano M, Zugmaier G, et al. Breast cancer: Influence of endocrine hormones, growth factors and genetic alterations. *Adv Exp Med Biol* 1993;330:119-41.
- Di Rosa P, Villaescusa JC, Longobardi E, Lotti G, Ferretti E, Diaz VM, et al. The homeodomain transcription factor Prep1 (pKnox1) is required for hematopoietic stem and progenitor cell activity. *Dev Biol* 2007;311(2):324-34.
- Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278(5):3275-85.
- Edelman GM, Jones FS. Outside and downstream of the Homeobox. *J Biol Chem* 1993;268(28):20683-6.
- Flinterman M, Gäken J, Farzaneh F, Tavassoli M, E1A-mediated suppression of EGFR expression and induction of apoptosis in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Oncogene* 2003;22(13):1965-77.
- Foley AC, Mercola M. Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev* 2005;19(3):387-96.
- Ford HL. Homeobox genes: A link between development, cell cycle, and cancer? *Cell Biol Int* 1998;22(6):397-400.

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

Giampaolo A, Sterpetti P, Bulgarini D, Samoggia P, Pelosi E, Valtieri M, et al. Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 1994;84(11):3637-47.

Gilbert SF, Opitz JM, Raff RA. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Dev Biol* 1996;173(2):357-72.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(12):5547-51.

Grandis JR, Tweardy DJ. TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. J Cell Biochem Suppl 1993;17F:188-91.

[Grandis JR](#), [Chakraborty A](#), [Zeng Q](#), [Melhem MF](#), [Tweardy DJ](#). Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 1998;69(1):55-62.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 2005;205(2):154-71.

[Gupta AK](#), [Bakanauskas VJ](#), [Cerniglia GJ](#), [Cheng Y](#), [Bernhard EJ](#), [Muschel RJ](#), et al. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* 2001;61(10):4278-82.

Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res* 2006;16(5):1-8.

Helliwell TR. Molecular markers of metastasis in squamous carcinomas. *J Pathol* 2001;194(3):289-93.

Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(23):1772-83.

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

Ikegawa S, Isomura M, Koshizuka Y, Nakamura Y. Cloning and characterization of ASH2L1 and ASH2L2, human and mouse homologs of the *Drosophila* ash2 gene. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84(3-4):167-72.

Imoto I, Pimkhaokham A, Watanabe T, Saito-Ohara F, Soeda E, Inazawa J. Amplification and overexpression of TGIF2, a novel homeobox gene of the TALE superclass, in ovarian cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276(1):264-70.

INCA – Instituto nacional do câncer. Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 22 nov. 2007.

Janmaat ML, Giaccone G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. Drugs Today (Barc) 2003;39 Suppl C:61-80.

Jordan RC, Daley T. Oral squamous cell carcinoma: new insights. *J Can Dent Assoc* 1997;63(7):517-8, 521-5.

Jordan KC, Clegg NJ, Blasi JA, Morimoto AM, Sen J, Stein D, et al. The homeobox gene mirror links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through notch activation. *Nat Genet* 2000;24(4):429-33.

Kelleher FC, Fennelly D, Rafferty M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncol* 2006;45(4):375-88.

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

Knoepfler PS, Calvo KR, Chen H, Antonarakis SE, Kamps MP. Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(26):14553-8.

Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, et al. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell* 2005;121(6):849-58.

La Celle PT, Polakowska RR. Human homeobox HOXA7 regulates keratinocyte transglutaminase type 1 and inhibits differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276(35):32844-53.

Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Thierrien M, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 1996;10(10):1284-95.

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

Lawrence HJ, Largman C. Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood* 1992;80(10):2445-53.

Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 2000;19(28):3220-4.

Liao W, Ho CY, Yan YL, Postlethwait J, Stainier DY. Hhex and scl function in parallel to regulate early endothelial and blood differentiation in zebrafish. *Development* 2000;127(20):4303-13.

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

Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol* 2003;39(2):106-14.

Lo RS, Wotton D, Massagué J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20(1-2):128-36.

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

Lopes MA, Nikitakis NG, Reynolds MA, Ord RA, Sauk JJr. Biomarkers predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofacial Surg* 2002;60(2):142-7.

Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, et al. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery* 2005;138(5):924-31.

Maconochie M, Nonchev S, Morrison A, Krumlauf R. Paralogous Hox genes: function and regulation. *Ann Rev Genet* 1996;30:529-56.

Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(14):6348-52.

Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103(2):295-309.

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.

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

Miyazaki H, Patel V, Wang H, Ensley JF, Gutkind JS, Yeudall WA. Growth factor-sensitive molecular targets identified in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma using microarray analysis. *Oral Oncol* 2006;42(3):240-56.

Ministério da Saúde. Ministério da Previdência e Assistência Social. Conselho Federal de Odontologia. O câncer de boca no Brasil. Bol. Do Pro-Onco, 1992 (Programa de Oncologia. Campanha Nacional de combate ao Câncer).

Moriya T, Seki N, Shimada K, Kato M, Yakushiji T, Nimura Y, et al. In-house cDNA microarray analysis of gene expression profiles involved in SCC cell lines. *Int J Mol Med* 2003;12(4):429-35.

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

Neville BW, Damn DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral maxillofacial pathology. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002.

NCBI. OMIM HOXA7. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=142950>. Acesso em: 22 nov. 2007a.

NCBI. OMIM ASH2L. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=604782>. Acesso em: 22 nov. 2007b.

NCBI. OMIM HHEX. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=604420>. Acesso em: 22 nov. 2007c.

NCBI. OMIM PITX1. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602669>. Acesso em: 22 nov. 2007d.

NCBI. OMIM TGIF. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602630>. Acesso em: 22 nov. 2007e.

Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 2003;10(1):1-21.

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

Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):876-85.

Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Lopes L, Nagahashi Marie SK. Expression of HOXC9 and E2F2 are up-regulated in CD133(+) cells isolated from human astrocytomas and associate with transformation of human astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2007;1769(7-8):437-42.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004;9(4):361-77.

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

Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK, et al. Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001;193(4):458-67.

Platz H, Fries R, Hudec M. Retrospective DOSAK Study on carcinomas of the oral cavity: results and consequences. *J Maxillfacial Surg* 1985;13(4):147-53.

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

Penkov D, Tanaka S, Di Rocco G, Berthelsen J, Blasi F, Ramirez F. Cooperative interactions between PBX, PREP and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2 (V) collagen (COL5A2) promoter. *J Biol Chem* 2000;275(22):16681-9.

Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. J Biol Chem 2000;275(46):35778-85.

Petrini M, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Carè A, et al. Expression of selected human HOX-2 genes in B/T acute lymphoid leukemia and IL-2/IL-1 β -stimulated natural killer lymphocytes. *Blood* 1992;80(1):185-93.

Puppini C, Puglisi F, Pellizzari L, Manfioletti G, Pestrin M, Pandolfi M, et al. HEX expression and localization in normal mammary gland and breast carcinoma. *BMC Cancer* 2006;6:192.

Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potencial molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas Head Neck; 2001;23(2):147-59.

Regezi JA, Jordan RC. Oral cancer in the molecular age. J Calif Dent Assoc 2001;29(8):578-84.

Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGR family/ErbB receptor family signaling network. BioEssays 1998;20(1):41-8.

Rodriguez-Canales J, Hanson JC, Tangrea MA, Erickson HS, Albert PS, Wallis BS, et al. Assessment of normalization strategies for quantitative RT-PCR using microdissected tissue samples. Lab Invest 2007;87(9):951-62.

Rowley H, Sherrington P, Helliwell TR, Kinsella A, Jones AS. P53 expression and p53 gene mutation in oral cancer and dysplasia. Otolaryngol Head Neck Surg 1998;118(1):115-23.

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.

Sánchez-Font MF, Bosch-Comas A, González-Duarte R, Marfany G. Overexpression of FABP7 in Down syndrome fetal brains is associated with PKNOX1 gene-dosage imbalance. Nucleic Acids Res 2003;31(11):2769-77.

Salles, FT. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína AKt em células cultivadas de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Sapp JP, Eversole LR. Contemporary oral and maxillofacial pathology. St Louis: Mosby; 2003.

Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. Eur J Cancer 2005;41(16):2428-37.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34⁺ subpopulations of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(25):12223-7.

Schnabel CA, Abate-Shen C. Repression by HoxA7 is mediated by the homeodomain and the modulatory action of its N-terminal-arm residues. *Mol Cell Biol* 1996;16(6):2678-88.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WI, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316(5829):1341-5.

Scott MP. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 1992;71(4):551-3.

Skelly RH, Korbonits M, Grossman A, Besser GM, Monson JP, Geddes JF, Burrin JM. Expression of the pituitary transcription factor Ptx-1, but not that of the trans-activating factor Prop-1, is reduced in human corticotroph adenomas and is associated with decreased alpha-subunit secretion. *J Clin Endocr Metab* 2000;85(7):2537-42.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007;445(7130):881-5.

Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Pathology & Genetics, WHO Classification Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon, 2005:430p. 163-75.

Sotsios Y, Ward SG. Phosphoinositide3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Res* 2000;177:217-35.

Stanton P, Richards S, Reeves J, Nikolic M, Edington K, Clark L, et al. Epidermal growth factor receptor expression by human squamous cell carcinomas of the head and neck, cell lines and xenografts. *Br J Cancer* 1994;70(3):427-33.

Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev* 1996;55(1):91-108.

Tahara S, Kurotani R, Sanno N, Takumi I, Yoshimura S, Osamura RY, et al. Expression of pituitary homeobox 1 (Ptx1) in human non-neoplastic pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2000;13(10):1097-108.

Tanaka T, Inazu T, Yamada K, Myint Z, Keng VW, Inoue Y, et al. cDNA cloning and expression of rat homeobox gene, Hex, and functional characterization of the protein. *Biochem J* 1999;339(Pt1):111-7.

Thomas GJ, Hart IR, Speight PM, Marshall JF. Binding of TGF- β 1 latency-associated peptide (LAP) to α v β 6 integrin modulates behavior of squamous carcinoma cells. *Brit J Cancer* 2002;87(8):859-67.

Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(6):613-23.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328(3):184-94.

Wang J, Zhou Y, Yin B, Du G, Huang X, Li G, et al. ASH2L: alternative splicing and downregulation during induced megakaryocytic differentiation of multipotential leukemia cell lines. *J Mol Med* 2001;79(7):399-405.

Wang S, Rosenwald IB, Hutzler MJ, Pihan GA, Savas L, Chen JJ, et al. Expression of the eucariotic translation initiation factor 4E and 2alfa in non-hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1999;155(1):247-55.

Wells A, Gupta K, Chang P, Swindle S, Glading A, Shiraha H. Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts. Micros Res Tech 1998;43(5):395-411.

Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999;97(1):29-39.

Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* 2003;17(7):896-911.

Yeudall WA, Miyazaki H, Ensley JF, Cardinalli M, Gutkind JS, Patel V. Uncoupling of epidermal growth factor-dependent proliferation and invasion in a model of squamous carcinoma progression. *Oral Oncol* 2005;41(7):698-708.

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 57/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Amplificação por RT-PCR dos transcritos de genes homeobox em linhagens de carcinoma epidermóide estimuladas com ácido retinóico, EGF e TGF- β ", de responsabilidade da Pesquisadora **Marcia Sampaio Campos**, sob orientação do Professor Doutor **Fabio 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, 03 de maio de 2006

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

ANEXO B – Análise estatística

B.1 – Análise de variância para o gene ASH2L

<i>Fonte</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F crit</i>
Linhasgens	33,1392802	2	16,5696401	3,62473504	0,04755346	3,55456109
Tratamento	35,5961976	2	17,7980988	3,89346973	0,03934181	3,55456109
Interação	85,9943429	4	21,4985857	4,70297945	0,00894719	2,92774871
Resíduo	82,282848	18	4,57126933			
Total	237,012669	26				

B.2 – Influência do tratamento em cada linhagem celular para o gene ASH2L (Valor crítico de Tukey= 6,12)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>HN6</i>		
Controle x EGF	2,88	
Controle x TGF	5,98	
EGF x TGF	3,09	
<i>HN31</i>		
Controle x EGF	0,72	
Controle x TGF	3,80	
EGF x TGF	3,08	
<i>HaCat</i>		
Controle x EGF	3,25	
Controle x TGF	2,09	
EGF x TGF	5,34	

B.3 – Influência do tipo celular em cada tratamento para o gene ASH2L (Valor crítico de Tukey= 6,12)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>Controle</i>		
HN6 x HN31	4,09	
HN6 x HaCat	4,44	
HN31 x HaCat	0,35	
<i>EGF</i>		
HN6 x HN31	1,92	
HN6 x HaCat	4,80	
HN31 x HaCat	2,88	
<i>TGF</i>		
HN6 x HN31	1,91	
HN6 x HaCat	3,63	
HN31 x HaCat	5,54	

B.4 – Análise de variância para o gene HHEX.

<i>Fonte</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F crit</i>
Linhagens	3,886718519	2	1,943359259	0,571961405	0,574346707	3,55456109
Tratamento	31,93231207	2	15,96615604	4,699092558	0,022801131	3,55456109
Interação	96,73872726	4	24,18468181	7,117934841	0,001278205	2,92774871
Resíduo	61,15878867	18	3,397710481			
Total	193,7165465	26				

B.5 – Influência do tratamento em cada linhagem celular para o gene HHEX (Valor crítico de Tukey= 5,28)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>HN6</i>		
Controle x EGF	1,76	
Controle x TGF	5,98	Sim
EGF x TGF	4,22	
<i>HN31</i>		
Controle x EGF	0,77	
Controle x TGF	4,51	
EGF x TGF	5,28	Sim
<i>HaCat</i>		
Controle x EGF	1,01	
Controle x TGF	2,79	
EGF x TGF	3,80	

B.6 – Influência do tipo celular em cada tratamento para o gene HHEX (Valor crítico de Tukey= 5,28)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>Controle</i>		
HN6 x HN31	1,87	
HN6 x HaCat	4,10	
HN31 x HaCat	2,23	
<i>EGF</i>		
HN6 x HN31	0,66	
HN6 x HaCat	3,35	
HN31 x HaCat	4,01	
<i>TGF</i>		
HN6 x HN31	0,40	
HN6 x HaCat	4,67	
HN31 x HaCat	5,07	

B.7 – Análise de variância para o gene HOXA7

<i>Fonte</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F crit</i>
Linhagens	251,708481	2	125,854241	15,8181241	0,00010846	3,55456109
Tratamento	33,8146216	2	16,9073108	2,12501335	0,14841497	3,55456109
Interação	111,507038	4	27,8767596	3,50372018	0,02773317	2,92774871
Resíduo	143,213969	18	7,95633159			
Total	540,24411	26				

B.8 – Influência do tratamento em cada linhagem celular para o gene HOXA7 (Valor crítico de Tukey= 8,08).

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>HN6</i>		
Controle x EGF	2,40	
Controle x TGF	5,33	
EGF x TGF	2,93	
<i>HN31</i>		
Controle x EGF	2,12	
Controle x TGF	4,69	
EGF x TGF	6,81	
<i>HaCat</i>		
Controle x EGF	2,51	
Controle x TGF	1,92	
EGF x TGF	4,44	

B.9 – Influência do tipo celular em cada tratamento para o gene HOXA7 (Valor crítico de Tukey= 8,08)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>Controle</i>		
HN6 x HN31	8,87	Sim
HN6 x HaCat	7,84	
HN31 x HaCat	1,03	
<i>EGF</i>		
HN6 x HN31	4,35	
HN6 x HaCat	7,96	
HN31 x HaCat	3,61	
<i>TGF</i>		
HN6 x HN31	8,24	Sim
HN6 x HaCat	0,60	
HN31 x HaCat	7,64	

B.10 – Análise de variância para o gene PKNOX1

<i>Fonte</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F crit</i>
Linhagens	4,57646452	2	2,28823226	0,65188818	0,53293231	3,55456109
Tratamento	30,7144525	2	15,3572263	4,37507783	0,02828237	3,55456109
Interação	98,5495677	4	24,6373919	7,01887862	0,00137425	2,92774871
Resíduo	63,1828927	18	3,5101607			
Total	197,023377	26				

B.11 – Influência do tratamento em cada linhagem celular para o gene PKNOX1 (Valor crítico de Tukey= 5,36)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>HN6</i>		
Controle x EGF	2,56	Sim
Controle x TGF	6,77	
EGF x TGF	4,22	
<i>HN31</i>		
Controle x EGF	0,39	
Controle x TGF	4,12	
EGF x TGF	3,73	
<i>HaCat</i>		
Controle x EGF	1,11	
Controle x TGF	3,06	
EGF x TGF	4,17	

B.12 – Influência do tipo celular em cada tratamento para o gene PKNOX1 (Valor crítico de Tukey= 5,36)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>Controle</i>		
HN6 x HN31	2,52	
HN6 x HaCat	4,58	
HN31 x HaCat	2,06	
<i>EGF</i>		
HN6 x HN31	0,35	
HN6 x HaCat	3,14	
HN31 x HaCat	2,79	
<i>TGF</i>		
HN6 x HN31	0,13	
HN6 x HaCat	5,25	
HN31 x HaCat	5,12	

B.13 – Análise de variância para o gene TGIF

<i>Fonte</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F crit</i>
Linhagens	4,39518541	2	2,1975927	0,5070032	0,610646434	3,55456109
Tratamento	64,8068379	2	32,4034189	7,47574243	0,004330895	3,55456109
Interação	107,609523	4	26,9023806	6,20660643	0,002544762	2,92774871
Resíduo	78,0205507	18	4,33447504			
Total	254,832097	26				

B.14 – Influência do tratamento em cada linhagem celular para o gene TGIF (Valor crítico de Tukey= 5,96)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>HN6</i>		
Controle x EGF	3,41	Sim
Controle x TGF	7,97	
EGF x TGF	4,55	
<i>HN31</i>		
Controle x EGF	1,11	
Controle x TGF	5,24	
EGF x TGF	4,13	
<i>HaCat</i>		
Controle x EGF	2,58	
Controle x TGF	1,95	
EGF x TGF	4,52	

B.15 – Influência do tipo celular em cada tratamento para o gene TGIF (Valor crítico de Tukey= 5,96)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>Controle</i>		
HN6 x HN31	2,31	
HN6 x HaCat	3,23	
HN31 x HaCat	0,93	
<i>EGF</i>		
HN6 x HN31	0,00	
HN6 x HaCat	2,40	
HN31 x HaCat	2,40	
<i>TGF</i>		
HN6 x HN31	0,42	Sim
HN6 x HaCat	6,68	
HN31 x HaCat	6,25	

B.16 – Análise de variância para o gene PITX

<i>Fonte</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F crit</i>
Linhagens	28,6806654	2	14,3403327	4,28572615	0,03004104	3,55456109
Tratamento	81,3217414	2	40,6608707	12,151835	0,00045714	3,55456109
Interação	214,793743	4	53,6984358	16,0482183	9,3027E-06	2,92774871
Resíduo	60,2292307	18	3,34606837			
Total	385,025381	26				

B.17 – Influência do tratamento em cada linhagem celular para o gene PITX (Valor crítico de Tukey= 5,24)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>HN6</i>		
Controle x EGF	4,25	
Controle x TGF	9,29	Sim
EGF x TGF	5,04	
<i>HN31</i>		
Controle x EGF	0,99	
Controle x TGF	5,68	Sim
EGF x TGF	4,69	
<i>HaCat</i>		
Controle x EGF	5,16	
Controle x TGF	3,38	
EGF x TGF	8,54	Sim

Tabela B.18 – Influência do tipo celular em cada tratamento para o gene PITX (Valor crítico de Tukey= 5,24)

Comparação	Diferença entre médias	p<0,05
<i>Controle</i>		
HN6 x HN31	3,23	
HN6 x HaCat	2,35	
HN31 x HaCat	0,87	
<i>EGF</i>		
HN6 x HN31	0,04	
HN6 x HaCat	3,27	
HN31 x HaCat	3,31	
<i>TGF</i>		
HN6 x HN31	0,39	
HN6 x HaCat	10,32	Sim
HN31 x HaCat	9,93	Sim