MARIA FERNANDA SETÚBAL DESTRO RODRIGUES

Análise dos efeitos da superexpressão do gene *PROX1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal

São Paulo 2011

MARIA FERNANDA SETÚBAL DESTRO RODRIGUES

Análise dos efeitos da superexpressão do gene *PROX1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal Versão Corrigida

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.

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.

Catalogação da Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rodrigues, Maria Fernanda Setúbal Destro

Análise dos efeitos da superexpressão do gene PROX1 em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal / Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues; orientador Fabio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2011.

110p. : fig., tab.; 30 cm.

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

1. Genes homeobox. 2. Linhagem celular. 3. Carcinoma de células escamosas. I. Nunes, Fabio Daumas. II. Título.

Rodrigues MFSD. Análise dos efeitos da superexpressão do gene *PROX1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof(a). Dr(a).	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof(a). Dr(a)	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof(a). Dr(a)	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof(a). Dr(a)	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Aos meus pais, pelo amor mais puro e sincero, por toda dedicação, apoio e ajuda incondicional em todos os momentos. Minha eterna gratidão e admiração;

Ao meu querido marido, *Fabio*, pelo amor, apoio incondicional e companheirismo, fundamentais para a conclusão desta etapa. Minha gratidão e amor sincero.

À minha amada filha, *Melissa*, minha alegria de todos os dias. Meu amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Fabio Daumas Nunes** por seu exemplo de ética, honestidade e amizade construída durante estes anos. Agradeço pela confiança em mim depositada e pela paciência e dedicação em todas as etapas deste trabalho. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo convívio e conhecimento adquirido.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal, **Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Souza**, **Profa. Dra. Marina Helena C. G. de Magalhães**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr**, **Profa. Dra. Andrea Mantesso**, **Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins** e **Profa. Dra. Karen Lopes Ortega**, pelo convívio harmonioso e ensinamentos transmitidos.

À pesquisadora **Patrícia Severino**, pela sua disponibilidade e contribuição fundamental na realização e análise de resultados deste trabalho.

À **Prof. Dra. Márcia Martins Marques**, pela gentileza em permitir que utilizasse seu laboratório de Cultivo Celular, pelos conselhos, apoio e confiança em mim depositada. Agradeço pela convivência agradável e registro aqui toda minha admiração.

Ao **Prof. Dr. Roger Chammas** e pesquisadora **Andréia Hanada Otake**, da Faculdade de Medicina da USP, pela disponibilidade, colaboração e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo suporte sempre presente e por despertar em mim o amor à biologia molecular.

À **Prof. Dra. Mônica Fernandes Gomes**, do departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, pela sua amizade eterna, por despertar em mim o desejo do conhecimento e pesquisa e por contribuir de maneira brilhante para minha formação acadêmica;

Às queridas amigas **Camila de Oliveira Rodini**, **Flavia Caló de Aquino Xavier** e **Katiúcia Batista Paiva**, pelo companheirismo, conselhos, amizade, conhecimentos divididos e incentivos constantes durante toda esta jornada.

À minha querida amiga **Lília Alves Rocha**, pelo seu companheirismo e amizade sincera. Muito obrigada pela ajuda e incentivo nos momentos de necessidade.

À todos os colegas do laboratório de Patologia Molecular, **Michella**, **Carina Esteves**, **Fabio Prosdócimo**, **Juvani** e **Luís Henrique** pelo convívio, respeito e aprendizado durantes este anos.

À todos os colegas do laboratório de Cultura Celular, Leila, Stella, Cácio e Nilton pela receptividade, convívio extremamente agradável e amizade conquistada.

Aos alunos de iniciação científica, **Amanda**, **Nicole** e **Natália**, pela amizade conquistada, convivência agradável e ajuda durante a realização dos experimentos deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer à aluna **Natália** pela disponibilidade e ajuda incondicional.

À minha querida sogra, **Rosa**, por ter cuidado tão bem e com tanto amor de minha filha Melissa nos momentos em que estive ausente, permitindo que fosse possível a conclusão deste trabalho.

A todos os demais **colegas do curso de Pós-Graduação**, pelo saudável convívio e compartilhamento de idéias.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Bucal, em especial à **Edna** e **Débora** pelo auxílio, colaboração e generosidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (processo n° 08/06362-3) e Auxílio Pesquisa (processo n° 08/06223-3), viabilizando não somente minha dedicação exclusiva durante o período, mas também a realização deste trabalho.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e incentivaram esta jornada, guardarei sempre lembranças maravilhosas destes momentos

"A coísa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raíz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

RESUMO

Rodrigues MFSD. Análise dos efeitos da superexpressão do gene *PROX1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

Os genes homeobox são responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário, regulando proliferação e diferenciação celular. A expressão alterada do gene homeobox PROX1 já foi identificado em diferentes neoplasias, incluindo mama, esôfago, fígado, sistema biliar, linfomas e cavidade bucal. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da superexpressão do gene PROX1 em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal nos mecanismos de proliferação e diferenciação celular, apoptose e perfil global de expressão gênica. Após a superexpressão deste gene na linhagem celular SCC-9, foi realizada a análise de proliferação por meio dos ensaios de curva de proliferação celular, citometria de fluxo, índice de incorporação de BrdU ao DNA e expressão de Ki67. A diferenciação celular foi verificada por meio de reações imunocitoquímicas para as citoqueratinas 1, 10, 13, 14, 16, 18 e 19 e a apoptose foi avaliada por meio de células positivas para anexina-V e iodeto de propídeo. O ensaio de microarray foi realizado para avaliação do perfil global de expressão gênica na linhagem celular SCC9 com superexpressão do gene PROX1. Observou-se que a superexpressão do gene PROX1 promove redução da proliferação celular, bem como reduz a expressão das citoqueratinas 1, 13, 18 e 19. Não houve alteração na taxa de apoptose entre as células com superexpressão do gene PROX1 e controles. Os resultados do microarray revelaram a expressão diferencial significante de genes envolvidos com os processos de desenvolvimento, adesão e invasão celular. Desta maneira, estes resultados são fortemente sugestivos de que o gene PROX1 inibe a proliferação celular e contribui pa diferenciação do carcinoma epidermóide bucal.

Palavras-chave: Gene homeobox *PROX1*. Carcinoma epidermóide bucal Proliferação celular. Diferenciação celular. Rodrigues MFSD. Analisys of *PROX1* overexpression effects in an oral squamous cell carcinoma cell line [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

Homeobox genes encode transcription factors with an important role during normal development by controlling cellular proliferation and differentiation. Altered expression of PROX1 homeobox gene is related to many cancers, including those of the breast, esophagus, liver, billiary system and lymphomas. The aim of this study was evaluate the effects of PROX1 overexpression, in an oral squamous cell carcinoma cell line, on cellular proliferation and differentiation, apoptosis as well as gene expression prolfile. After overexpression of PROX1 gene in SCC9 cell line, proliferation was assessed by proliferation curve, flow citometry, BrdU incorporation differentiation DNA Ki67 Cell to and expression. was verified by immunocytochemistry to cytokeratins 1, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 and apoptosis was measured by annexin V positive cells. Gene expression profile was analyzed by microarray in PROX1-overexpressing cells and control. PROX1-overexpressing cells showed a statistically significant decrease in proliferation as well cytokeratin 1, 13, 18 and 19 expression. No significant differences from controls and PROX1overexpressing cells were observed in apoptosis. Microarray analyses showed differential expression of genes related to development, cellular adhesion an invasion. Our results strongly suggest that overexpression of PROX1 inhibit cell proliferation and contributes to differentiation of oral squamous cell carcinoma.

Key-words: Homobox gene *PROX1*. Oral squamous cell carcinoma. Cell proliferation. Cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 -Representação do protocolo de amplificação e marcação do cRNA utilizando uma cor única. A amostra marcada (tubo "B") é purificada, fragmentada e hibridada nas lâminas. Fonte: Protocolo One-Color Microarray-Based Gene Expression -Agilent Technologies..... 46 Figura 5.1 -(A) Razão da expressão normalizada para o gene PROX1 nas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25 em relação a linhagem QNO. (B) Western-blotting realizado com proteínas extraídas das células SCC, utilizando anticorpo específico para PROX1 e β-actina. Pode-se observar menor expressão de mRNA е proteína PROX1 na linhagem SCC-9 em relação às demais 50 linhagens..... Figura 5.2 -(A) Gel de agarose 1% mostrando a integridade do RNA total utilizado no experimento de gRT-PCR. (B) Razão da expressão normalizada do gene PROX1 na linhagem SCC9 e nos clones celulares transfectados com os vetores pCMV6 (controle) e pCMV6-PROX1. (C) Reação de Western-blotting anti-PROX1 realizado com extrato protéico obtido a partir dos clones celulares transfectados com os vetores acima. Foi evidenciada superexpressão do gene PROX1 nos clones celulares SCC9-PROX1 comparado com a linhagem não transfectada (SCC9) e transfectada com o vetor controle..... 52 Figura 5.3 -Resultado representativo de três curvas de proliferação celular. mostrando que os clones celulares SCC9 pCMV6-PROX1 C1. C2 e C3 apresentam menor potencial proliferativo em todos os períodos analisados quando comparados com a linhagem SCC9 e o clone celular SCC9-pCMV6, as guais apresentaram celular similar p<0.001: crescimento (* p<0,05)..... 53 Figura 5.4 -Distribuição da linhagem SCC9 e clones celulares nas fases do ciclo celular, após sincronização em meio livre de soro e posterior crescimento em meio contendo 10% FBS por 24 horas. É possível observar uma menor porcentagem de células superexpressando PROX1 nas fases S/G2/M, em comparação com os controles (* p<0,05)..... 54

- Figura 5.5 (A) Imagem representativa da incorporação de BrdU na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) nos clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X).(C) Os resultados representam a média ± desvio padrão de células positivas em uma contagem de 1.000 células. Nota-se maior incorporação de BrdU na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 quando comparado com os clones celulares que apresentam superexpressão do gene PROX1 (p<0,05).....</p>
- Figura 5.6 (A) Imagem representativa da reação imunocitoquímica para a linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X). (C) Os valores representam a média ± desvio padrão de células positivas em uma contagem de 1.000 células. Pode ser observada importante redução da proliferação celular nos clones celulares que apresentam superexpressão do gene *PROX1* (p<0,05)..... 56
- Reação imunocitoquímica para CK1 (A) e (B), CK 10 (C) e (D), Figura 5.7 -CK13 (E) e (F). (A), (C) e (E) correspondem a imagem representativa para a reação imunocitoquímica com os anticorpos descritos acima para a linhagem SCC9 e SCC9pCMV6 e (B), (D) e (F) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3. Houve maior expressão de CK1 e CK13 nas células controle quando comparado com os clones celulares SCC9-PROX1. Em detalhe, observa-se marcação intensa para **CK13** células periféricas das nas ilhotas (C) (400X).....
- Figura 5.8 Reação imunocitoquímica para CK14 (A) e (B) e CK16 (C) e (D). (A) e (C) correspondem a imagem representativa para a reação imunocitoquímica na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) e (D) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X). Pode-se observar uma marcação citoplasmática homogênea para as CK14 e CK 16 em todas as células......
- Figura 5.9 Reação imunocitoquímica para CK18 (A) e (B) e CK19 (C) e (D). (A) e (C) correspondem a imagem representativa para a reação imunocitoquímica na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) e (D) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X). Houve intensa marcação citoplasmática para as CK18 e CK19 na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 quando comparada com os clones celulares superexpressando o gene *PROX1.* (A) e (C) Em detalhe, observa-se padrão de marcação mais intenso ao redor no núcleo em algumas células (400X).
- Figura 5.10 Representação gráfica da expressão das citoqueratinas CK1 (A), CK10 (B), CK13 (C), CK14 (D), CK16 (E), CK18 (F) e CK19 (F) nos diferentes grupos celulares. Houve diferença

59

60

55

- **Figura 5.15** Expressão do gene *PROX1* analisada por *microarray* nos clones celulares SCC9-pCMV6 e SCC9-PROX1. Observou-se que o clone celular SCC9-PROX1 C3 apresenta o maior nível de expressão de *PROX1* nas duas réplicas realizadas.....
- Figura 5.16 Expressão dos genes *HOXD3*, *MEIS3* e *ITGA4* no clone celular controle (SCC9-pCMV6) e SCC9-PROX1. Nota-se expressão reduzida destes genes nos clones celulares superexpressando o gene PROX1, apesar da variabilidade de expressão encontrada para o mesmo clone na duplicata experimental....
- **Figura 5.17** Expressão dos genes *MMP2*, *TIMP3* e *MMP1* no clone celular controle (SCC9-pCMV6) e SCC9-PROX1. Nota-se menor expressão dos genes *MMP2* e *TIMP3* nos clones celulares superexpressando o gene *PROX1*. Em relação ao gene *MMP1*,

74

Figura 5.18 - Razão da expressão normalizada pó qRT-PCR para os genes MEIS3, HOXD3, ITGA4, MMP2, TIMP-3 e MMP1. Foi observado níveis reduzidos de expressão para os gene MEIS3, HOXD3, ITGA4, MMP2 e TIMP-3 nos três clones celulares analisados em relação ao controle SCC9-pCMV6. O gene MMP1 apresentou-se superexpresso em todos os clones celulares SCC9-PROX1. De acordo com os resultados acima, houve validação dos dados de expressão do *microarray* para os referidos genes.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Genes alvos utilizados para amplificação por RT-qPCR, de acordo com o número de acesso no <i>GenBank</i> , a sequência dos primers e o tamanho do produto	38
Tabela 4.2 -	Relação dos anticorpos utilizados nas reações de Western- blotting	39
Tabela 4.3 -	Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas, segundo a diluição e o fabricante	43
Tabela 4.4 -	Genes alvos utilizados para amplificação por qRT-PCR para validação do experimento de <i>microarray</i> . Número de acesso no <i>GenBank</i> , sequência dos primers e tamanho do produto	48
Tabela 5.1 -	Descrição dos genes relacionados com proliferação celular e seus respectivos <i>fold-change</i> após análise de expressão do <i>microarray</i>	72
Tabela 5.2 -	Descrição dos genes selecionados para validação por qRT- PCR e seus respectivos <i>fold-change</i> após análise de expressão do <i>microarray</i>	73
Tabela 5.3 -	Valores de expressão obtidos para os genes selecionados na análise de microarray e qRT-PCR. Os valores representam a média de expressão dos clones celulares SCC9-PROX1 em relação ao controle SCC9-pCMV6	76
Tabela 4.1 -	Genes alvos utilizados para amplificação por RT-qPCR, de acordo com o número de acesso no <i>GenBank</i> , a sequência dos primers e o tamanho do produto	38
Tabela 4.2 -	Relação dos anticorpos utilizados nas reações de Western- blotting	39
Tabela 4.3 -	Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas, segundo a diluição e o fabricante	43
Tabela 4.4 -	Genes alvos utilizados para amplificação por qRT-PCR para validação do experimento de <i>microarray</i> . Número de acesso no <i>GenBank</i> , sequência dos primers e tamanho do produto	48
Tabela 5.1 -	Descrição dos genes relacionados com proliferação celular e seus respectivos <i>fold-change</i> após análise de expressão do	

	microarray	72
Tabela 5.2 -	Descrição dos genes selecionados para validação por qRT- PCR e seus respectivos <i>fold-change</i> após análise de expressão do <i>microarray</i>	73
Tabela 5.3 -	Valores de expressão obtidos para os genes selecionados na análise de microarray e qRT-PCR. Os valores representam a média de expressão dos clones celulares SCC9-PROX1 em relação ao controle SCC9-pCMV6	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Genes homeobox	20
2.2 Gene <i>PROX1</i>	21
2.3 Gene <i>PROX1</i> e oncogênese	24
2.4 Genes homeobox em carcinoma epidermóide	230
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Linhagens celulares	34
4.2 Transformação do Plasmídio	34
4.3 Superexpressão do gene <i>PROX1</i>	35
4.4 Isolamento do RNA	36

4.5 Síntese do DNA Complementar (cDNA)
4.6 PCR quantitativo (qRT-PCR)
4.7 Preparação dos extratos protéicos
4.8 Separação eletroforética de proteínas e western blotting
4.9 Proliferação celular
4.9.1 Curvas de proliferação
4.9.2 Citometria de fluxo para análise do ciclo celular
4.9.3 Índice de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)
4.9.4 Imunocitoquímica para Ki67
4.10 Imunocitoquímica para citoqueratinas
4.11 Ensaio de apoptose
4.12 Experimento de <i>microarray</i>
4.12.1 Síntese de cDNA, amplificação e marcação do cRNA com Cy3
4.12.2 Hibridação e aquisição dos dados
4.12.3 Quantificação da expressão gênica e análise de dados
4.12.4 Validação dos resultados de <i>microarray</i> por qRT-PCR
4.13 Análise estatística
5 RESULTADOS
5.1 Expressão de <i>PROX1</i> nas SCC
5.2 Superexpressão do gene <i>PROX1</i>
5.3 Efeito da superexpressão do gene PROX1 sobre a proliferação
celular
5.4 Efeito da superexpressão do gene PROX1 sobre a expressão de
citoqueratinas
5.5 Efeito da superexpressão do gene PROX1 na morte
celular
5.6 Experimento de microarranjo
5.6.1 Padrões de expressão gênica global entre as amostras
analisadas
5.6.2 Análise de genes diferencialmente expressos entre os clones celulares
SCC9-PROX1 e SCC9-pCMV6
5.6.3 Validação dos resultados de expressão do microarray por RT-qPCR
6 DISCUSSÃO

7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

Os genes homeobox são genes responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário (Maroulakou; Spyropoulos, 2003). Embora estes genes sejam classicamente conhecidos por controlar a proliferação e diferenciação celular, e necessários para a morfogênese celular e tecidual (Abate-Shen, 2002; Maroulakou; Spyropoulos, 2003; Samuel; Naora, 2005), estudos recentes têm demonstrado a participação destes genes em eventos biológicos cruciais para a célula eucariótica adulta em condições normais e na oncogênese (Gehring; Hiromi, 1986; Abate-Shen, 2002; Maroulakou; Spyropoulos, 2003; Del Bene; Wittbrodt, 2005; Grier et al., 2005; Samuel; Naora, 2005). A principal função destes genes consiste na ativação ou inibição da expressão de genes alvos, mecanismo pelo qual controlam proliferação, diferenciação, apoptose, interação célula-célula e célula-matriz extracelular.

O gene PROX1 (Prospero related homeobox 1) pertence à família de genes homeobox não agrupados, sendo um fator de transcrição com papel importante durante a linfangiogênese, desenvolvimento do fígado, pâncreas e diferenciação de várias estruturas neuroectodérmicas (Reis et al., 2005). Este gene se liga a regiões promotoras específicas modulando a atividade de genes alvos independentemente ou em conjunto com outros genes homeobox (Samuel; Naora, 2005). Além de seu papel na morfogênese e diferenciação, vários autores já descreveram alterações do gene PROX1 na carcinogênese. Acredita-se que o silenciamento epigenético e mutações pontuais são os principais responsáveis pela inativação do gene PROX1 em diferentes tipos de carcinomas, incluindo mama, esôfago, fígado, sistema biliar e linfomas (Hong et al., 2002; Hong; Detmar, 2003; Nagai et al., 2003; Laerm et al., 2007; Versmold et al., 2007). A ausência de expressão deste gene promove alteração nos mecanismos de diferenciação celular, desregulação de proteínas regulatórias do ciclo celular, entre elas ciclinas A e E, resultando em ganho de proliferação e distúrbio nos mecanismos de apoptose. Sabe-se ainda que este gene atua na regulação da molécula de adesão E-caderina e mudanças no padrão de sua expressão podem influenciar na neoformação vascular durante o desenvolvimento tumoral e metástase (Versmold et al., 2007). Entretanto, devido ao fato do gene PROX1 desempenhar papel multifuncional, sua função biológica pode se alterar de

acordo com o estágio de desenvolvimento, órgão e tipos de câncer. Neste sentido, apesar da ausência de expressão do gene *PROX1* estar associada com maior proliferação e pior prognóstico em algumas neoplasias como mama, fígado e pâncreas, a superexpressão deste gene já foi identificada em neoplasias sangúineas, carcinoma de cólon e glioblastomas.

Apesar de muitos estudos terem avaliado a expressão dos genes homeobox em diversos tipos de tumores sólidos e leucemias, existem poucos estudos na literatura analisando a expressão de genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca. Resultados obtidos no laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia de São Paulo revelaram que dentre vários genes expressos em amostras de carcinomas epidermóides orais analisados, o gene *PROX1* apresenta-se altamente expresso na margem em relação ao tumor, sugerindo que a perda de expressão deste gene possa estar associada com o desenvolvimento desta neoplasia. Entretanto, não se sabe qual o papel funcional deste gene no desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da superexpressão do gene *PROX1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal nos principais mecanismos associados com o fenótipo maligno, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Genes Homeobox

Os genes homeobox codificam fatores de transcrição que atuam durante a embriogênese e o desenvolvimento tecidual por meio de um sistemático controle da proliferação e diferenciação celular (Abate-shen, 2002). Estes genes foram inicialmente descobertos em Drosophila melanogaster como genes homeóticos, responsáveis pela segmentação ântero-posterior nas fases iniciais da embriogênese, contribuindo fortemente para a correta localização das estruturas corporais (Lewis, 1978). Essa descoberta foi possível devido ao fenômeno denominado homeose, causado por mutações nestes genes e caracterizado pela transformação de um segmento corporal em outro (Samuel; Naora, 2005). Um exemplo típico corresponde ao da mutação no gene Antenappedia, o qual resulta na formação de patas no locas das antenas.

Em humanos os genes homeobox são divididos em dois grandes grupos: os genes agregados, também conhecidos como genes HOX ou classe I de genes homeobox, os quais têm grande homologia com os genes do complexo HOM-C de Drosófilas, e os genes não agregados, que não estão envolvidos em transformações homeóticas (Stein et al., 1996). Mais de 200 genes homeobox já foram identificados no genoma humano, sendo divididos em famílias de acordo com a sua homologia e similaridade funcional (Stein et al., 1996). Destacam-se as famílias HOX, *prospero* (PROX), *paired* (PAX), *orthodenticle* (OTX), *muscle segment* (MSX), *distales* (DLX) e *caudal* (CDX) (Stein et al., 1996; Del Bene; Wittbrodt, 2005; Grier et al., 2005).

Os genes homeobox controlam a organogênese e a formação corporal durante a embriogênese, tendo também papel significante na regulação da hematopoiese (Samuel; Naora, 2005). Estes genes codificam proteínas nucleares específicas denominadas homeoproteínas, que agem como fatores de transcrição e desempenham um papel fundamental na especificação da identidade celular (Samuel; Naora, 2005). Os genes homeobox apresentam uma seqüência comum e altamente conservada de 183 nucleotídeos que codificam 61 aminoácidos, conhecida como homeodomínio (Gehring; Hiromi, 1986; Ford et al., 1998). O

homeodomínio está usualmente localizado na posição terminal ou subterminal da homeoproteína correspondente, sendo responsável pela ligação ao DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos protéicos dos genes homeobox (McGinnis; Krumlauff, 1992; Abate-Shen, 2002). Os homeodomínios interagem com o DNA primariamente por meio de núcleos de repetição (motifs) caracterizados pela seqüência TAAT (Manak; Scott, 1994). Apesar da comprovação de que as homeoproteínas atuam como fatores de transcrição, existem poucos exemplos de genes alvo que são especificamente regulados *in vivo* por estas proteínas. Além disso, supõe-se que a especificidade funcional das homeoproteínas é controlada em muitos níveis, incluindo modificações pós-transcricionais, transporte núcleo-citoplasma e interação com outras proteínas (Abate-Shen, 2002).

O papel destes genes no desenvolvimento embrionário tem sido amplamente investigado desde sua descoberta (Bendall; Abate-Shen, 2000). Muitos trabalhos sugerem o envolvimento de diferentes genes homeobox em processos cruciais das células eucariontes, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular (Magli et al., 1991; Manak; Scott, 1994; Hung et al., 2003), interação célula-célula e célula-matriz extracelular (Pattin et al., 2000). Além disso, sabe-se que estes genes têm efeitos diferentes no ciclo celular, de um lado, estimulando a proliferação de células progenitoras, e por outro, induzindo a diferenciação celular (Del Bene; Wittbrodt, 2005). Os genes homeobox regulam um amplo espectro de funções biológicas durante o desenvolvimento embrionário, incluindo a formação dos membros, o padrão do esqueleto axial, a morfogênese craniofacial, o desenvolvimento do sistema nervoso central, trato gastrintestinal e órgãos reprodutivos (Samuel; Naora, 2005). Além de atuarem durante o desenvolvimento embrionário, os genes homeobox também são expressos no tecido adulto, no qual atuam na manutenção da arquitetura tecido-específica e regulam funções importantes como gametogênese (Srebrow et al., 1998), angiogênese (Daftary; Taylor, 2000) e hematopoiese (Samuel; Naora, 2005).

2.2 Gene PROX1

O gene homeobox *PROX1* foi originalmente identificado em camundongos devido à sua homologia à proteína *prospero* de *Drosophila* (Oliver et al., 1993). Na embriogênese do camundongo, o gene *PROX1* é expresso durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, pâncreas, fígado, musculatura esquelética e coração (Oliver et al., 1993). Até o momento, o gene *PROX1* já foi clonado de humanos, camundongos, galinha e sapo, sendo suas sequências protéicas altamente conservadas entre as espécies, sugerindo um papel essencial deste gene no desenvolvimento dos vertebrados (Schaefer et al., 1999).

O gene *PROX1* em humanos está localizado no cromossomo 1q32.2 e consiste de 48707 pares de bases e 5 éxons. Em diferentes tecidos já foram identificados tamanhos distintos de transcritos correspondentes ao gene *PROX1*, resultantes provavelmente de splicing alternativos. Sabe-se que este gene apresenta longas regiões 5' e/ou 3' não traduzidas, com funções ainda desconhecidas na literatura (Tomarev et al., 1998).

Como característico dos genes homeobox, o gene *PROX1* se liga a sequências promotoras específicas, modulando a atividade transcricional de genes alvos, tanto independentemente quanto em associação com outras homeoproteínas (Hassan, 1997). Sua função na regulação da expressão de diferentes genes é bastante complexa, uma vez que pode atuar como corepressor de receptores de hormônio nucleares assim como ativador ou repressor transcricional por meio de ligação direta ao DNA. Assim, este gene pode desempenhar função distinta em um mesmo órgão durante estágios diferentes de desenvolvimento em decorrência de sua atividade como fator de transcrição (Chen et al., 2008).

A participação do gene *PROX1* é essencial durante o desenvolvimento do sistema linfático e na determinação do destino de diferentes tipos celulares. A análise de camundongos *PROX1*⁻ deficientes mostrou que a expressão deste gene é fundamental para que ocorra a formação de vasos linfáticos, migração de hepatócitos, diferenciação de células da retina, desenvolvimento pancreático e cardíaco (Takahashi et al., 2006).

Wigle e Oliver (1999) demonstraram que células endoteliais de camundongos *knockout* para o gene *PROX1* falham em adquirir o fenótipo linfático e se mantém como células endoteliais sanguíneas. Por outro lado, o ganho de expressão de *PROX1* promove a diferenciação linfática destas células, associado com a inibição da expressão de genes relacionados com a formação e/ou manutenção de vasos sanguíneos e ativação de genes associados com o desenvolvimento linfático, como receptor-3 do fator de crescimento vascular endotelial e podoplanina (Hong et al., 2002). Estes achados demonstram que o gene *PROX1* representa um marcador nuclear específico de vasos linfáticos sendo especificamente necessário para a diferenciação de células endoteliais sanguíneas em células endoteliais linfáticas (Hong; Detmar, 2003).

No fígado e pâncreas, o gene *PROX1* é expresso no endoderma que irá originar estes órgãos, permanecendo expresso também no tecido adulto. Camundongos *knockout* para *PROX1* morrem em ED14.5, apresentando uma redução de 70% no tamanho do fígado em decorrência da reduzida proliferação dos hepatoblastos, os quais falham em migrar para o mesoderma adjacente (Sosa-Pineda et al., 2000).

A expressão gênica durante a diferenciação celular do sistema nervoso central é regulada pela expressão do gene *PROX1* em estágios precoces de diferenciação de células-tronco neuroepiteliais em neurônios e células da glia. Além disso, está presente nas células da zona subventricular e estágios pós-natal precoces, sendo comumente encontrado no tálamo e cerebelo (Elsir et al., 2010).

Risebro et al. (2009) demonstraram que o gene *PROX1* é essencial para a manutenção e maturação do sarcômero em cardiomiócitos em desenvolvimento, os quais são cruciais para o crescimento hipertrófico e maturação do miocárdio embrionário.

Um dos mecanismos pelo qual o gene *PROX1* atua durante o desenvolvimento embrionário é o controle da proliferação celular. Alguns trabalhos têm demonstrado que a ausência de expressão de *PROX1* promove uma proliferação descontrolada, juntamente com a redução de expressão de genes que inibem o ciclo celular (Shimoda et al., 2006). A inativação de *PROX1* promove a formação de lentes oculares alteradas, as quais falham em polarizar e alongar apropriadamente em decorrência do acentuado ganho de proliferação celular. Acredita-se que a ausência de expressão deste gene esteja associada com redução da expressão de p27^{KIP1} e p57^{KIP2}, perda de expressão de E-caderina e apoptose inapropriada (Wigle et al., 1999).

2.3 Gene PROX1 e oncogênese

Os genes homeobox, dentre eles, o gene *PROX1*, representam um exemplo clássico da íntima relação entre embriogênese e neoplasia. Muitos estudos demonstraram que tanto a perda quanto o ganho de função dos genes homeobox estão associadas com o desenvolvimento e progressão de várias neoplasias (Abate-Shen, 2002). Muitos dos genes homeobox que são normalmente expressos nos tecidos embrionários estão presentes de maneira aberrante no câncer (Myers et al., 2000; Abate-Shen, 2002; Grier et al., 2005). Esta expressão desregulada altera o fenótipo e o comportamento celular, levando à diminuição da diferenciação e a promoção da proliferação e sobrevivência celular, aumentando a predisposição para o desenvolvimento e/ou progressão tumoral (Samuel; Naora, 2005).

Vários estudos registraram diferenças na expressão dos genes homeobox entre tecido normal e neoplásico, porém sua relação funcional com o fenótipo maligno ainda permanece obscura em muitos casos. A expressão dos genes homeobox em tumores pode ser dividida em três categorias (Abate-Shen, 2002). A primeira categoria inclui os genes homeobox que são re-expressos nas células tumorais derivadas de tecidos nos quais os genes são normalmente expressos durante a embriogênese. A segunda classe é caracterizada por genes homeobox que são expressos nas células tumorais, mas não são normalmente expressos nas células em que o tumor se originou durante a embriogênese ("nova" expressão) (Abate-Shen, 2002). A terceira categoria é representada por genes que mostram uma expressão reduzida em células tumorais quando comparado com o tecido normal. Estes genes são freqüentemente expressos em tecidos adultos e têm uma expressão reduzida ou silenciada em neoplasias (Abate-Shen, 2002).

Diferenças importantes têm sido detectadas na expressão do gene *PROX1* em neoplasias malignas quando comparado com os tecidos adultos normais correspondentes. Em decorrência de sua participação no controle de processos celulares importantes tanto para o desenvolvimento embrionário quanto para a oncogênese, o gene *PROX1* têm sido considerado com um gene supressor de tumor (Laerm et al., 2007).

Shimoda et al. (2006) investigaram a participação do gene *PROX1* em tecido hepático normal, linhagens celulares e amostras de carcinoma hepatocelular. O

tecido hepático normal e tumores bem diferenciados apresentaram maiores níveis de expressão de *PROX1*, sendo que a redução de expressão deste gene esta significantemente associada com estágio tumoral mais avançado. Tumores pouco diferenciados mostraram níveis reduzidos e/ou ausência de expressão de *PROX1*. Além disso, observou-se que amostras de tumores com alta expressão de *PROX1* estão relacionadas com prognóstico mais favorável e maior sobrevida dos pacientes em 5 anos. Ensaios funcionais realizados em linhagens celulares derivadas de carcinoma hepatocelular revelaram que a inibição da expressão de *PROX1* promoveu acelerado crescimento celular enquanto a superexpressão deste gene resultou na redução de proliferação.

Duas isoformas de mRNA do gene *PROX1* foram identificadas por Dudas et al. (2008), sendo mais prevalente a isoforma longa em carcinoma hepatocelular (7,9kb) e a isoforma curta em carcinoma colangiocelular (2,9 kb). Os autores não identificaram diferença significante na expressão de *PROX1* entre amostras de fígado normal, fígado cirrótico e carcinoma hepatocelular. Entretanto, observaram uma mutação missenso no domínio *prospero*, em códons conservados, em amostra de carcinoma hepatocelular com alta expressão de *PROX1*, sugerindo que esta mutação pode estar envolvida com a inativação ou alteração de função do gene *PROX1*. Foi observado ainda que proteínas *Zinc-finger* são altamente expressas em carcinoma hepatocelular e ainda são capazes de se ligar a sequências regulatórias do gene *PROX1*, contribuindo para sua regulação positiva.

Em amostras de pâncreas normal, observou-se que o gene *PROX1* encontrase altamente expresso, principalmente em células do parênquima pancreático exócrino. Entretanto, uma minoria de células neoplásicas derivadas deste órgão apresentou expressão de *PROX1*, sendo esta expressão ausente em muitas amostras. Neste mesmo estudo, a expressão do gene *PROX1* foi menor em amostras de pacientes com sobrevida de até 6 meses após o diagnóstico quando comparado com amostras de carcinoma pancreático de pacientes com maior sobrevida. Assim, a alta expressão de *PROX1* em carcinoma pancreático está associada com melhor prognóstico deste tipo de neoplasia. Baixos níveis de expressão de *PROX1* também foram observados em linhagens celulares derivadas de carcinoma pancreático pouco diferenciado (Schneider et al., 2005). Baseando-se nos achados acima, os autores sugerem que o gene *PROX1* pode ser considerado como um marcador de fácil uso na gradação histopatológica em câncer de pâncreas e também como fator prognóstico.

Em linhagens celulares derivadas de carcinoma de esôfago, observou-se que a expressão do gene *PROX1* é induzida por IFN-gama via STAT1. Nestas mesmas células, o silenciamento do gene PROX1 por meio de RNAi foi acompanhado pela supressão da ação antiproliferativa de INF-gama. Por outro lado, a superexpressão de PROX1 foi capaz de inibir a proliferação celular, incluindo células resistentes ao tratamento com INF-gama. Assim, a expressão do gene *PROX1* é essencial para que ocorra a inibição do crescimento celular via administração de INF-gama. De acordo com este estudo, o gene *PROX1* pode ser considerado um gene alvo para o desenvolvimento de novas terapias de combate ao câncer de esôfago (Akagami et al., 2011), uma vez que apresenta função antiproliferativa.

Takahashi et al. (2006) estudaram o envolvimento de mutações do RNA no gene PROX1 em linhagens celulares de carcinoma pancreático e de colon em processos celulares associados com o fenótipo maligno. A mutação da molécula de RNA corresponde um dos mecanismos capazes de alterar a informação genética sem afetar o DNA genômico. Assim, ocorre alteração do mRNA e consegüente síntese de isoformas protéicas, as quais não são identificadas a partir do DNA genômico inalterado. Os autores demonstraram a presença de quatro mutações na molécula de RNA, localizada no domínio N-terminal do gene PROX1 em diferentes linhagens celulares e amostras de carcinoma pancreático, cólon e esôfago. Para determinar o impacto destas mutações na tumorigênese, o mRNA não mutado e mutado foi clonado na linhagem celular Miapaca2 (derivada de carcinoma pancreático) e na linhagem 293 (derivada de tecido hepático embrionário). Células com superexpressão de PROX1 mRNA mutado apresentaram alta taxa de proliferação celular, formaram colônias em "soft agar" e resultaram em tumores maiores e com crescimento mais rápido quando comparados com os tumores originados de células contendo o mRNA do gene PROX1 não mutado. De acordo com os achados descritos acima, acredita-se que o gene PROX1 atue como um gene supressor de tumor ou como um fator regulador da progressão das características malignas das células cancerosas derivadas de carcinoma pancreático (Takahashi et al., 2006). Mutações de mRNA no gene PROX1 também foram observadas por Yoshimoto et al. (2007) em 4 de 8 amostras de carcinoma de esôfago avaliadas, sem mutações genômicas presentes.

Mutações pontuais do gene *PROX1* foram observadas em quatro linhagens celulares derivadas de neoplasias linfáticas, resultando em troca de aminoácidos e formação de proteínas truncadas. Tanto a deleção da base Timina na posição 2376 e mutação missense no códon 577, estão localizadas em regiões altamente conservadas e críticas do homeodomínio, podendo ser responsáveis por eliminar ou alterar a função deste gene. Outro mecanismo investigado por Nagai et al. (2003), neste mesmo trabalho, foi a metilação do gene *PROX1*, uma vez que este apresentou expressão reduzida ou ausente em 16 das 29 linhagens celulares derivadas de neoplasias hematológicas. Observou-se que há hipermetilação do DNA em ilhas CpG II localizadas no íntron 1, estando associada com o silenciamento do gene *PROX1* nas linhagens avaliadas que apresentaram ou não mutações, de maneira que duas vias de inativação deste gene podem coexistir em uma mesma neoplasia. Assim, acredita-se que tanto a presença de mutações puntuais quanto a hipermetilação do DNA sejam responsáveis pela perda de expressão do gene *PROX1* em neoplasias hematológicas (Nagai et al., 2003).

O gene PROX1 encontra-se localizado na região cromossômica 1g32.2-1q32.3, a qual mostra-se frequentemente alterada em carcinomas de mama. Utilizando análise de metilação por *microarray*, Versmold et al. (2007) identificaram um fragmento rico em ilhas CpG na região promotora do gene PROX1, o qual encontra-se hipermetilado em 3 de 5 amostras de carcinoma de mama invasivo porém ausente em tecido de mama adjacente à neoplasia e tecido mamário normal proveniente de paciente sem neoplasia. Amostras tumorais com ilhas CpG hipermetiladas apresentaram redução do transcrito do gene PROX1. Por outro lado, o tratamento com 5'AZA resultou em significante redução da metilação em ilhas CpG Il e reativação da expressão de PROX1 em linhagens celulares. Além disso, a expressão deste gene foi significantemente menor em metástases de cérebro em relação a tumores primários de carcinomas de mama. Provavelmente, mudanças na expressão de PROX1 podem influenciar nos mecanismos de metástases via hematogênica, uma vez que a ausência de expressão deste gene promove a formação de estruturas vasculares sanguíneas ao invés de induzir a diferenciação linfática. Em resumo, PROX1 apresenta expressão reduzida em carcinomas de mama e mestástase cerebrais originadas desta neoplasia, participando assim de sua progressão tumoral (Versmold et al., 2007).

Em amostras de carcinoma do sistema biliar, 60% dos casos apresentaram redução da expressão de *PROX1*, embora não tenha sido encontrada relação com as características histopatológicas do tumor. Nesta neoplasia, assim como evidenciado em tumores de mama, o silenciamento do gene *PROX1* também parece estar associado com hipermetilação de sua região promotora bem como mutações na extremidade carboxi-terminal, resultando na formação de uma proteína não funcional (Laerm et al., 2007).

Muitos trabalhos têm demonstrado que a perda de expressão do gene *PROX1* está associada com aumento da atividade mitótica, em decorrência da desregulação de proteínas controladoras do ciclo celular e aumento de expressão de proteínas que favorecem a progressão tumoral, dentre elas p57^{KIP2} e p27^{KIP1}. Entretanto, este gene desempenha papel multifuncional, e, portanto, sua função biológica pode se alterar de acordo com o estágio de desenvolvimento, órgão e tipos de câncer. Neste sentido, apesar da ausência de expressão do gene *PROX1* estar associada com maior proliferação e pior prognóstico em algumas neoplasias como descrito anteriormente, alguns trabalhos têm demonstrado que este gene encontrase superexpresso em neoplasias sanguíneas, carcinoma de cólon e tumores cerebrais (Petrova et al., 2008; Elsir et al., 2010; Elsir et al., 2011).

Recentemente, foi demonstrado que o ganho de expressão do gene *PROX1* constitui um marcador de transição do adenoma de cólon para carcinoma *in situ*. A perda de expressão de *PROX1* em linhagens celulares inibe a progressão tumoral enquanto sua superexpressão está associa com o desenvolvimento de câncer de cólon. Petrova et al. (2008) sugerem que neste tipo de câncer, o gene *PROX1* não atue nos mecanismos de proliferação e diferenciação celular, mas sim no controle da adesão celular, interações com a matriz extracelular e polaridade da célula. Isto foi evidenciado pelo fato de que a perda de expressão de *PROX1* não interfere com a diferenciação celular nem induz a expressão de reguladores do ciclo celular, mas está associada com a expressão de vias de sinalização de moléculas de adesão e remodelação do citoesqueleto. Em resumo, em câncer de cólon, o gene *PROX1* não atua como um gene supressor de tumor, apresenta expressão aumentada em resposta a ativação aberrante da via TCF/ β -catenina e sua superexpressão é importante para a progressão tumoral via alteração da polaridade e adesão celular. Além disso, *PROX1* não é necessário nos estágios iniciais do desenvolvimento

tumoral do câncer de cólon, mas sim no estabelecimento de lesões displásicas *in situ* que evoluem para carcinoma.

No estudo realizado por Elsir et al. (2010), o gene *PROX1* apresentou aumento de expressão em tumores cerebrais de acordo com a gradação. Baixos níveis de expressão foram observados em condições não-neoplásicas e em astrocitomas grau I enquanto altos níveis de expressão foram observados em astrocitomas grau IV. Nestes, *PROX1* foi intensamente expresso em áreas tumorais intensamente proliferativas. Entretanto, o índice de marcação de Ki67 e PCNA nas células *PROX1* positivas foi menor em comparação ao índice encontrado em todas as células dentro de uma mesma parte do tumor, sugerindo que estas células se dividem mais lentamente em relação às demais células tumorais. A relação entre a expressão de *PROX1* e sobrevida de pacientes portadores de gliomas grau II foi recentemente verificada por Elsir et al. (2011). Maior porcentagem de células tumorais positivas para *PROX1* está associada com um fenótipo mais agressivo em gliomas e apresenta valor como marcador prognóstico em gliomas grau II (Elsir et al., 2010; Elsir et al., 2011).

Recentemente, estudos sobre vascularização em neoplasias têm sido amplamente conduzidos, uma vez que angiogênese e linfangiogênese são cruciais para o entendimento da biologia tumoral e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Neste sentido, *PROX1* têm sido amplamente investigado quanto a sua participação em lesões e neoplasias vasculares. Este gene apresenta alta expressão em tumores de origem vascular, como sarcoma de Kaposi e linfangiomas, hemangiomas capilares e cavernosos (Reis et al., 2005).

A superexpressão do gene *PROX1* em hemangioendoteliomas promove a aquisição de fenótipo invasivo *in vivo*, aumenta a taxa de invasão celular *in vitro*, induz a expressão de genes envolvidos com migração e proteólise, participando ainda da reprogramação das células tumorais, as quais passam a expressar genes associados com o endotélio linfático. Desta maneira, o gene *PROX1* favorece a aquisição de um fenótipo tumoral mais agressivo, caracterizado pelo aumento de invasão local e anaplasia celular, resultante da desregulação de genes que controlam a diferenciação celular. De fato, células de hemangioendoteliomas apresentando expressão ectópica de *PROX1* exibem fenótipo e genótipo

semelhante ao encontrado em sarcoma de Kaposi, sendo este gene importante para o comportamento maligno deste tipo de neoplasia (Dadras et al., 2008).

2.4 Genes homeobox em carcinoma epidermóide

Apesar de muitos estudos terem relatado a expressão desregulada e diferencial de genes homeobox em diferentes neoplasias, pouco se sabe sobre o papel funcional destes genes no desenvolvimento e/ou progressão tumoral. Em relação ao carcinoma epidermóide de boca, existem poucos trabalhos na literatura que investigaram a participação dos genes homeobox na carcinogênese oral.

Zhu et al. (2004) avaliaram a expressão de transcritos do gene homeobox *QUOX-1* e sua respectiva proteína em epitélio oral normal, displásico e em carcinoma epidermóide de boca. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que o tecido epitelial normal não expressa o gene *QUOX-1*, sendo que sua expressão aumenta de acordo com a progressão da displasia.

A expressão dos membros da família HOX de genes homeobox em displasias e carcinomas epidermóides orais foi avaliada por Hassan et al. (2006). Os genes HOXA2, HOXB2, HOXD3, HOXD4, HOXD8 e HOXD9 apresentaram maiores níveis de expressão quando comparado com os demais genes HOX em amostras de mucosa oral normal. As amostras de carcinoma epidermóide bucal demonstraram níveis elevados de expressão dos genes HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXB3, HOXB7, HOXB9, HOXC4, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC11, HOXC13, HOXD9, HOXD10 e HOXD11 guando comparado com as amostras de mucosa normal, sugerindo que a superexpressão ou a re-expressão de alguns genes HOX podem estar associada com o desenvolvimento tumoral. Os tecidos displásicos demonstraram níveis reduzidos de expressão dos genes HOXA1, HOXB7, HOXB9 e HOXC8 em relação às amostras de carcinoma oral, podendo a superexpressão destes genes estar associada à transformação de condições malignizáveis da cavidade oral. Este estudo também analisou a expressão dos genes HOX em amostras de carcinoma epidermóide oral com e sem metástases para linfonodos. A expressão dos genes HOXC4-HOXC8 foi maior nas amostras de CEC oral com metástases, sugerindo que a expressão destes genes pode

desempenhar papel fundamental na progressão e metástase do carcinoma epidermóide bucal.

A análise de transcritos e proteína do gene homeobox *TGIF1* foi recentemente avaliada por Matizonkas et al. (2011). Foi demonstrado que este gene encontra-se altamente expresso no tecido oral normal, sendo fracamente expresso em amostras de carcinoma epidermóide bucal. Além disso, a expressão de *TGIF1* foi mais intensa em áreas tumorais bem diferenciadas em relação a regiões pouco diferenciadas.

Embora estes trabalhos tenham detectado diferenças no padrão de expressão de genes homeobox em amostras de epitélio normal, displasia e carcinoma epidermóide bucal, o papel que estes genes exercem nos diferentes mecanismos celulares associados com a aquisição do fenótipo maligno permanece obscuro. Neste sentido, Destro et al. (2010), investigaram a participação funcional do gene *HOXB7* em carcinoma epidermóide bucal. Foi observado que este gene encontra-se superexpresso em amostras de carcinoma epidermóide bucal em relação ao tecido normal, e ainda, a superexpressão deste gene na linhagem celular HaCAT foi capaz de aumentar a proliferação celular. Por outro lado, a inibição de *HOXB7* por meio de RNAi resultou em redução da proliferação celular. A análise imunoistoquímica revelou que tumores altamente positivos para *HOXB7* apresentaram maior marcação para Ki67, sendo a alta expressão de *HOXB7* correlacionada com estágio TNM e com menor taxa de sobrevida.

Yamatoji et al. (2010) verificaram que o gene *HOXA10* apresenta alta expressão em carcinoma epidermóide bucal e linhagens celulares derivadas desta neoplasia em relação ao epitélio oral normal. Observaram ainda que a alta expressão deste gene está associada com o tamanho do tumor, estágio mais avançado e com menor sobrevida em 5 anos. Os autores sugerem que o gene HOXA10 pode ser considerado um marcador diagnóstico e prognóstico em carcinoma epidermóide bucal.

Rodini (2008) analisou a expressão de transcritos de genes homeobox por *microarray* em amostras de carcinoma epidermóide bucal mais agressivo (classificados com T1/N⁺ e T2/N⁺) e menos agressivo (classificados com T3/N0). Foi observado uma superexpressão dos genes *IRX4*, *HOXC13* e *ZHX2* em tumores mais agressivos e dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *PROX1* em tumores menos agressivos. Após a análise de expressão destes genes por PCR quantitativo em

tempo real (RT-qPCR) em 40 amostras de carcinoma epidermóide bucal pareados com sua respectiva margem, não houve validação dos critérios de agressividade. Entretanto, os genes *ZHX1* e *PROX1* apresentaram-se mais expresso nas margens em relação à neoplasia, sugerindo que a perda de expressão destes genes no carcinoma epidermóide bucal possa estar associada com o seu desenvolvimento. É importante ressaltar que não existe na literatura trabalhos que avaliaram a participação do gene *PROX1* em carcinoma epidermóide bucal. Baseando-se nestes resultados, obtidos no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, o gene *PROX1* foi selecionado para a realização deste trabalho e investigação de sua participação funcional no carcinoma epidermóide bucal.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como proposição analisar os efeitos da superexpressão do gene *PROX1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral nos mecanismos de proliferação, diferenciação celular e apoptose, bem como no perfil de expressão gênica. Especificamente, pretende-se:

- a) Realizar a superexpressão do gene *PROX1* em uma linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal;
- b) Analisar a capacidade de proliferação de uma linhagem celular com superexpressão do gene *PROX1* por meio dos ensaios de curva de proliferação, citometria de fluxo, BrdU e imunocitoquímica para Ki-67;
- c) Analisar a expressão das citoqueratinas (CK) 1, 10, 13, 14, 16, 18 e 19 em uma linhagem celular apresentando superexpressão do gene *PROX1* por imunocitoquímica;
- d) Analisar se a linhagem celular superexpressando o gene *PROX1* mostra modificação na taxa de apoptose;
- e) Verificar diferenças no perfil global de expressão do mRNA da linhagem celular superexpressando o gene *PROX1*, utilizando a técnica do *microarray* e validar seis genes diferencialmente expressos por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares

As células derivadas de carcinoma epidermóide bucal SCC-4 (CRL-1624), SCC-9 (CRL-1629), SCC-15 (CRL-1623) e SCC-25 (CRL-128) (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta), provenientes da *American Type Culture Colection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75cm² (NUNC, Naperville, IL, EUA) em meio de cultivo DMEN/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen) e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. As células utilizadas nos experimentos foram cultivadas até que atingissem uma confluência de 70-80%. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultivo trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular.

Foi incluída neste estudo, uma linhagem de queratinócito oral normal (QON) gentilmente cedida e cultivada de acordo com Klingbeil et al. (2009).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da FOUSP (protocolo n 149/2008) (Anexo A).

4.2 Transformação do Plasmídio

Os plasmídios de expressão eucariótica pCMV6 e pCMV6-PROX1 (PS100001 e RC201140 respectivamente, Origene, Rockville, USA) foram utilizados neste trabalho para a superexpressão do gene *PROX1*.

A transformação de 50 μ l de bactérias *E. coli* competentes DH5- α (Invitrogen) foi feita através de choque térmico (45 seg a 42°C, 2 min no gelo), seguida pela adição de 450 μ l de meio SOC e incubação por 1 h em estufa agitadora a 37 °C.
Após esse período foi feita a semeadura em placas de Petri contendo meio LB-ágarkanamicina (25ug/ml) e incubação em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 h. As colônias isoladas foram expandidas em 2 ml de meio LB contendo kanamicina por cerca de 8 horas a 37 °C e posteriormente em 15 ml de meio LB-kanamicina por 16 horas a 37 °C sob intensa agitação (250 rpm). As bactérias foram então centrifugadas por 15 min a 4°C e utilizadas para extração de DNA plasmidial, utilizando-se o *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Germantown, MD, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos DNAs plasmidiais foi determinada no Nanodrop (Thermo-Scientific, Wilmington, DE, USA) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, para se obter a concentração e pureza, respectivamente.

4.3 Superexpressão do gene PROX1

A linhagem celular SCC-9 foi semeada em placas de cultivo de 28,2 cm (Nunc) em meio de cultivo apropriado contendo 10 % de FBS e incubada até a confluência de 80-90 %. Esta linhagem foi selecionada por apresentar níveis reduzidos de expressão do gene PROX1, viabilizando sua utilização para o ensaio de superexpressão. Neste momento, foi então transfectada com 2 µg/ml dos vetores plasmidiais pCMV6 e pCMV6-PROX1 utilizando-se o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) na concentração de 5 µg/ml, de acordo com as instruções do fabricante. A mistura DNA/lipofectamina foi feita em OptiMEM (Invitrogen) e após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente os complexos foram adicionados às placas de cultivo. Após 6 horas, o meio de transfecção foi substituído por meio de cultivo convencional acrescido de 10 % de FBS por aproximadamente 48 horas. Após esse período, procedeu-se a tripsinização, centrifugação e seleção dos clones em meio contendo o antibiótico Geneticina na concentração 300 µg/ml (G-418, Invitrogen). As células foram colocadas em placas de cultivo celular de 28,2 cm² nas proporções 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 em meio de cultivo contendo o antibiótico de seleção. O meio foi trocado a cada 3-4 dias até que fossem visualizadas colônias individualizadas. Os clones sobreviventes foram selecionados, expandidos e congelados em nitrogênio

líquido. Os clones celulares foram a seguir cultivados para extração do RNA e obtenção de extratos protéicos e realização de reações de "western-blotting" e qRT-PCR. Três clones celulares transfectados com o vetor pCMV6-PROX1 e um clone celular transfectado com o vetor pCMV6 (controle) foram selecionados para os experimentos de proliferação, diferenciação celular, apoptose e *microarray*.

4.4 Isolamento do RNA

O RNA total foi extraído das cultivos celulares pelo uso da técnica de isoticianato de guanidina, seguindo recomendaçãoes do fabricante. Os clones celulares foram lavados com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e incubadas com 1,5 ml de TRIzol (Invitrogen) por 5 minutos. Após a lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,3 ml de clorofórmio. Após a centrifugação a 12.000 xg durante 15 min a 4 C, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis e foram adicionados 0,75 ml de álcool isopropílico por mililitro de solução desnaturante. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 xg por 10 min a 4 C. Neste momento foi possível observar a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo. A solução sobrenadante foi descartada e foi adicionado 1 ml de álcool a 75% gelado. Após centrifugação a 6.000 xg durante 5 min, o álcool foi descartado e o RNA foi ressuspendido em água livre de DNAse e RNAse. A concentração do RNA foi determinada em Nanodrop com comprimento de onda de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C até o momento de sua utilização. Um µg de RNA foi misturada com 5x tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol), aquecidos durante 10 min a 70°C e separados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 1 h a 60V para análise de sua integridade.

4.5 Síntese do DNA Complementar (cDNA)

O cDNA utilizado nas reações de qRT-PCR foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando-se o *High Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosytems) num volume final de 21 ul, partindo-se de 4 ug de RNA total. Para a síntese do cDNA, as amostras foram incubadas em termociclador (Termociclador Matercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetidos a 25°C por 10 min seguidos de 120 min a 37°C e 85°C por 5 min.

4.6 PCR quantitativo (qPCR)

As reações de qPCR, para análise dos níveis de expressão do gene *PROX1* nos clones celulares selecionados, foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied BiosystemsCarlsbad, CA, USA), fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Byosistems), primers específicos para o gene *PROX1* e para o gene constitutivo *HPRT* (Tabela 4.1). Os primers para os genes *PROX1* e *HPRT* foram desenhados utilizando-se o software Gene Tool 2.0 (Biotools Incorporated, Edmonton, Alberta, Canada). A linhagem de queratinócito oral normal (QNO) foi utilizada como amostra calibradora.

Os produtos da RT serviram de molde para a amplificação por qPCR, sendo todas as reações realizadas num volume final de 25 µL em tubos óticos com os seguintes reagentes: 1 µL dos primers *sense* e *antisense* para os genes *PROX1* (concentração final de 400nM) e *HPRT* (concentração final de 400nM), 12,5 µl Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA (1 µL) e água. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg e 60°C por 1 min. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindose a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Para cada par de *primers* foi realizada qPCR utilizando-se água estéril (*blank*) para avaliação de sua possível contaminação.

A análise quantitativa da expressão foi realizada de acordo com o método matemático de Pfaffl (2001) e a eficiência da reação de PCR foi obtida utilizando-se 5 diluições seriadas do cDNA da linhagem celular HaCAT, quantificada em triplicata. A eficiência da reação para cada gene analisado foi determinada por meio da respectiva diluição do cDNA X valores de Ct e calculada por meio da equação E = $10^{(-1/slope)}$, na qual 'E' é a eficiência e 'slope' representa o coeficiente angular da reta. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e as amostras de cDNA em cada reação foram analisadas em triplicata, sendo consideradas para quantificação somente àquelas com desvio padrão $\leq 0,05$ entre os valores de Ct.

Tabela 4.1 - Genes alvos utilizados para amplificação por qRT-PCR, de acordo com o número de acesso no *GenBank*, a sequência dos primers e o tamanho do produto

Gene	GenBank	Primers 5' \rightarrow 3'	Tamanho do produto (bp)
PROX1	NM_002763.3	F: ctccgtggaactcagcgc	145
		R: gccggcttaagagggctg	140
HPRT1	NM_000194	F: ccaccaccctgttgctgta	119
		R: tcccctgttgactggtcat	

4.7 Preparação dos extratos protéicos

Os precipitados de células para a extração protéica foram obtidos por meio de tripsinização celular, quando as mesmas encontravam-se em confluência de aproximadamente 70-80%. As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris pH 8,0, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF. Foi adicionado inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich) ao tampão de lise imediatamente antes do uso. Duzentos microlitros deste tampão foram colocados sobre os precipitados celulares, os quais foram desagregados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Depois deste período foi realizada centrifugação a 12.000 *xg* por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo alíquotas de

5µl de cada extrato separadas para quantificação protéica. Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados em gelo seco e transferidos para *freezer* -80 °C, no qual foram mantidos até o momento do uso. A quantidade de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo kit de quantificação protéica BCA (BCA Protein Assay Kit, 23225, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) em comprimento de onda de 562 nm.

4.8 Separação eletroforética de proteínas e Western-blotting

Trinta microgramas de proteínas de cada extrato celular foram misturadas com um tampão de amostra redutor 4x concentrado (2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,001 % de azul de bromofenol, 2% de ß-mercaptoetanol), aquecidas a 95 C por 5 minutos e separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS a 8% ou 12%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Invitrogen) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6 mM de glicina e 20% de metanol por um período de duas horas e trinta minutos a 50 V. Logo após, todas as membranas foram coradas com o corante *Ponceau S* (Sigma-Aldrich) para verificar a eficácia da transferência e bloqueadas por 1 hora a 4 °C em uma solução contendo 10% leite em pó desnatado dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1 % de Tween 20 (TBST). As membranas foram a seguir incubadas por 16 horas a 4 °C com os anticorpos primários relacionados na tabela 4.2, os quais foram diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado.

Anticorpos	Clone	Fabricante	Diluição
PROX1	Monoclonal	Abcam	1:500
β-actina	AC-15	Sigma-Aldrich	1:3000

Após a incubação com o anticorpo primário, foram realizadas três lavagens de 15 minutos com TBST, seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase na diluição de 1:1000 (anti-IgG de camundongo, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 1 hora a temperatura ambiente. Depois de mais três lavagens de 15 minutos com o mesmo tampão, as membranas foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – Amersham ECL *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, E.U.A.).

4.9 Proliferação celular

Para comparar o potencial proliferativo dos clones celulares que apresentaram superexpressão do gene *PROX1* foram realizadas curvas de proliferação celular, citometria de fluxo para análise de ciclo celular, imunocitoquímica para Ki-67 e ensaio de incorporação de BdrU.

4.9.1 Curvas de proliferação

Para cada linhagem foi feito o plaqueamento de 5x10³ células em 1 ml de meio DMEM/F12 contendo 10% de FBS em cada poço de placas para cultivo celular de 24 poços (Nunc). Após 16 horas, os poços foram lavados com PBS, o meio trocado por DMEM/F12 livre de FBS e as células incubadas por mais 48 horas. Para estimular o crescimento celular, ao término deste período foi novamente colocado o meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS. Nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a adição do meio com FBS, as células de três poços de cada placa foram lavadas com PBS e incubadas com 0,3 ml de tripsina a 37°C, até que todas estivessem completamente separadas do fundo da placa. A tripsina foi inativada com 1 ml de meio DMEM/F12 com 10% de FBS e alíquotas de 100 µl foram utilizadas para contagem. Todas as contagens foram feitas em triplicata utilizando-se

câmara de Newbauer e os experimentos repetidos três vezes. Após obtenção dos valores médios de cada período, foram construídas curvas de proliferação utilizandose o programa GraphPad Excel (Microsoft, E.U.A.).

4.9.2 Citometria de fluxo para análise do ciclo celular

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental coordenado pelo Prof. Roger Chammas, do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em colaboração com a pesquisadora Andreia Hanada Otake.

Para análise da distribuição das células nas fases proliferativas do ciclo celular (S, G2 e M), foram plaqueadas 6×10^5 células em placas de cultivo celular de 60 mm de diâmetro. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por DMENF12 sem FBS e as células foram incubadas por mais 48 horas. Após este período, foi acrescido meio DMENF12 por 24 horas e as células foram então tripsinizadas, lavadas em PBS e fixadas em álcool 70% gelado por 16 horas. As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e os precipitados desagregados com 500 µl de uma solução contendo RNAse A a 0,2 mg/ml, Triton X-100 (0,01%) e 20 µg/ml de iodeto de propídio em PBS e incubados a temperatura ambiente sob abrigo da luz por 30 minutos. A distribuição das células no ciclo celular foi analisada utilizando-se o software CellQuest (Becton Dickinson). Dez mil eventos foram analisados para cada amostra em comprimento de onda de 488nm.

4.9.3 Índice de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)

A linhagem celular SCC-9 e os clones celulares selecionados foram plaqueados na concentração de 2,5 $\times 10^4$ células por poço em lâminas de cultivo de 8 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 48h de cultivo em meio DMENF12 sem FBS, foi acrescentado meio de cultivo contendo

10% FBS para indução da proliferação celular por 24h. Após este período, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado meio de cultivo fresco acrescido de BrdU na diluição de 1:100 por 2 h. Em seguida, as células foram lavadas e fixadas em etanol 70% gelado por 15 min a 4 C. A incorporação de BrdU nas células em proliferação foi revelada por meio de imunocitoquímica, utilizando-se o BrdU Staining Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em duplicata. O índice de incorporação de BrdU, expresso como a porcentagem de células positivas para BrdU, foi determinado pela contagem de 1000 células da linhagem SCC-9 e clones celulares, utilizando o sistema de imagem KONTROM 400 (Zeiss Axio Imager A1).

4.9.4 Imunocitoquímica para Ki67

As linhagens celulares foram plaqueadas na concentração de 2,5x10⁴ células por poço em lâminas de cultivo de 8 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 48h de cultivo em meio DMENF12 sem FBS, foi acrescentado meio de cultivo contendo 10% FBS para indução da proliferação celular por 24h. Após este período, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 min. Após a inibição da peroxidase endógena e bloqueio em PBS+BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente, as células foram incubadas com anticorpo anti Ki67 (1:400) por 16 horas e posteriormente, com anticorpo secundário conjugado a biotina e complexo estreptavidina-biotinaperoxidase (Envision Dual Link System HRP, Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 min a temperatura ambiente. As reações foram feitas em duplicata, reveladas com diaminobenzidina (DAB, Dako) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. O índice imunocitoquímico da expressão de Ki67, representado pela porcentagem de células positivas para este marcador, foi determinado por meio da contagem de 1000 células da linhagem SCC-9 e clones celulares utilizando-se utilizando o sistema de imagem KONTROM 400 (Zeiss Axio Imager A1).

4.10 Imunocitoquímica para citoqueratinas

As células foram plaqueadas na concentração de 2,5x10⁴ células por poço em lâminas de cultivo de 8 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 h de cultivo celular, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 min. Após a inibição da peroxidase endógena e bloqueio em PBS+BSA 1% por 1h a temperatura ambiente, as células foram incubadas com os anticorpos anti-CK1, anti-CK13, anti-CK14, anti-CK-16, anti-CK18 e anti-CK19 por 16 horas, de acordo com as diluições descritas na tabela 4.3. Em següência, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a dextrana e polímero HRP (Envision Dual Link System HRP) por 30 min a temperatura ambiente. As reações foram realizadas em diplicata, reveladas com DAB (Dako) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Após o processamento imunocitoquímico, todas as lâminas foram escaneadas utilizando-se o aparelho ScanScope ® GL System (Aperio Technologies, Inc., California, USA). As imagens digitalizadas foram analisadas por meio do software Aperio ImageScope Viewer ®, utilizando-se o algorítimo Positive Pixel Count v9. A porcentagem de marcação positiva para cada citoqueratina, representada pela razão de marcação positiva e marcação total (positiva e negativa) foi considerada para análise estatística.

Anticorpo	Diluição	Fabricante
CK1	1:200	Abcam
CK10	1:100	Biogenex
CK13	1:100	Abcam
CK14	1:2000	Abcam
CK16	1:300	Abcam
CK18	1:1500	Dako
CK19	1:2000	Dako

Tabela 4.3 - Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas, segundo a diluição e o fabricante

4.11 Ensaio de apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado utilizando-se o *Single Channel Annexin V/ Dead Cell Apoptosis* Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas 8x10⁵ células, as quais foram lavadas em PBS e o precipitado desagregado com um tampão de ligação contendo Anexina V-FITC (1:500) e iodeto de propídio. O índice de apoptose foi determinado em citômetro de fluxo, correspondendo ao número de células positivas para Anexina V-FITC e negativas para iodeto de propídio em comprimento de onda 521 e 524 nm, respectivamente. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

4.12 Experimento de microarray

O experimento de *microarray* foi integralmente realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP), sob orientação da Pesquisadora Patrícia Severino.

Para a realização deste experimento, foram selecionados três clones celulares que apresentaram maior expressão de mRNA do gene *PROX1* e um clone celular transfectado com o vetor pCMV6. O RNA total foi extraído como descrito acima e verificado quanto à sua integridade em um gel de agarose 1%, como descrito anteriormente.

O protocolo utilizado para esse experimento foi o One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), em conjunto com as lâminas do tipo Whole Genome Oligo 44K (Agilent Technologies). Cada *array* contém cerca de 45.000 sondas sintetizadas *in situ*, com 60mer, compreendendo tanto sondas únicas e réplicas biológicas, bem como controles positivos e negativos destinados aos procedimentos de avaliação de qualidade e normalização durante a análise dos resultados. O sistema de uma cor utilizado neste experimento, no qual as hibridizações são independentes, consiste na marcação e hibridização individual de cada amostra de RNA em um *array*. As reações foram realizadas em duplicatas, e desta maneira, foram feitas 8 hibridações utilizando-se as amostras: SCC9-pCMV6, SCC9-PROX1 Clone1(C1), Clone 2 (C2) e Clone 3 (C3).

4.12.1 Síntese de cDNA, amplificação e marcação do cRNA com Cy3

Foi utilizado 1 ug de RNA total para o início do experimento, de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA foram avaliadas pelo equipamento NanoDrop (Thermo-Scientific), e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%. O protocolo utilizado para a síntese e marcação do cRNA foi o Quick Amp Labeling Kit One Color (Agilent Technologies); um esquema resumido desse protocolo é apresentado na figura 4.1. Primeiramente, foi sintetizado um cDNA a partir do RNA total das amostras acima, utilizando-se o T7 promoter primer e uma mistura contendo 5X Strand Buffer, 0,1M DTT, 10mM dNTPs, RNAse out e Affinity Script, seguida da incubação a 40°C por 2 horas e 15 min a 70°C. Foi adicionado ao cDNA resultante da etapa anterior, uma mistura contendo 5X Transcription Buffer, 0,1M DTT, dNTPs, T7 RNA polimerase e Cyanine 3-CTP (Cy3), sendo as misturas incubadas a 40°C por 2 horas, com a finalidade de se obter um cRNA marcado com Cy3. Após este período, as amostras foram purificadas com o kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante e quantificadas com o equipamento Nanodrop (Thermo-Scientific). Nesse momento foram avaliados a concentração do cRNA e o rendimento de incorporação de Cy3 ao cRNA, sendo todas as amostras consideradas adequadas para a hibridação subseqüente.

4.12.2 Hibridação e aquisição dos dados

Utilizou-se 1,65ug de cRNA para a reação de hibridação, o qual foi incubado por 30 minutos a 60°C juntamente com 10X *Blocking Agent*, 25X *Fragmentation Buffer* e água livre de RNAse/DNase para obtenção de cRNA fragmentado. Este foi em seguida hibridado às lâminas *Whole Genome Oligo* 44K (Agilent Technologies)

as quais foram incubadas em estufa a 65°C e submetidas a 10 rotações por minuto por 17 horas. Após o período de hibridação, as lâminas foram lavadas com os tampões de lavagem, estabilização e secagem, preparados com o *Kit Gene Expression Hybridization* (Agilent Technologies). A aquisição das imagens foi realizada com o Scanner GenePix 4000B (Axon), seguindo recomendações do fabricante das lâminas.



Figura 4.1 – Representação do protocolo de amplificação e marcação do cRNA utilizando uma cor única. A amostra marcada (tubo "B") é purificada, fragmentada e hibridada nas lâminas. Fonte: Protocolo One-Color Microarray-Based Gene Expression – Agilent Technologies 4.12.3 Quantificação da expressão gênica e análise de dados

A quantificação das intensidades e a correção para eliminação do ruído de fundo foram realizadas com o programa *Feature Extraction* v 9.5.1. Para a avaliação da semelhança nos padrões de expressão gênica global entre as amostras, utilizouse o agrupamento hierárquico com distância Euclideana e o algoritmo *average linkage*. A Análise das Componentes Principais (PCA) foi utilizada para avaliar a variação na expressão gênica global entre amostras distintas. As análises mencionadas acima foram realizadas com o programa Partek[®] (versão 6.6 Copyright © 2010 Partek Inc., St. Louis, MO, USA) após normalização por quantil. A identificação de genes com possível expressão diferencial entre as amostras foi realizada através do cálculo da razão entre a intensidade de fluorescência dos clones SCC9-PROX1 C1, C2, C3 em relação ao clone SCC9-pCMV6, dada como *fold-change* nos resultados.

Os genes diferencialmente expressos foram agrupados e analisados quanto à sua participação em diferentes processos celulares utilizando-se o consórcio de banco de dados *Gene Ontology* (Ashburner et al., 2000). Em seguida, foram realizados os testes estatísticos de Bonferroni, Benjamini e FDR (False Discovery Rate), com a finalidade de avaliar se há relevância dos genes diferencialmente expressos e agrupados dentro de um processo celular, em relação a todos os genes da base de dados relatados como integrantes desta determinada função biológica.

4.12.4 Validação dos resultados de microarray por qRT-PCR

Seis genes diferencialmente expressos na análise do experimento de *microarray* foram selecionados para validação por RT-qPCR. As reações de qPCR foram realizadas como descrito anteriormente, utilizando-se primers específicos para os genes listados na tabela 4.4. As condições das reações foram: 1 µL dos primers *sense* e *antisense* para os genes *MEIS3, HOXD3, MMP1, MMP2, TIMP3* e *ITGA4* (400nM), 12,5 µl SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA (1 µL) e água. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por

10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg e 60°C por 1 min. O clone celular SCC9-pCMV6 foi utilizado como amostra calibradora para o cálculo dos níveis de expressão dos genes citados acima.

Gene	GenBank	Primers 5' \rightarrow 3'	Tamanho do
			produto (bp)
HOXD3	NM_006898.4	F: gtctcgacagaactccagcag R: cgctcgtgtatgccgtgcgta	145
MEIS3	NM_001009813.1	F: ggtggagaacatgagcacttg R: gtgtgagaggtgctggaacaa	132
MMP1	NM_001145938.1	F: acacgccagatttgccaaga R: cgatgatctcccctgacaaa	145
MMP2	NM_001127891.1	F: cgatgatctcccctgacaaa R: t ggattcgagaaaaccgcagt	149
TIMP3	NM_000362.4	F: ccaccaccctgttgctgta R ttcggcacgctggtctaca	56
ITGA4	NM_000885.4	F: gcatacaggtgtccagcagaga R: aggaccaaggtggtaagcagct	126

Tabela 4.4 - Genes amplificados por qRT-PCR para validação do experimento de *microarray*, segundo o número de acesso no *GenBank*, sequência dos primers e tamanho do produto.

4.13 Análise estatística

Para a comparação dos efeitos da superexpressão do gene *PROX1* sobre a proliferação celular, expressão de citoqueratinas e apoptose, foi utilizado o teste de análise de variância *One way* ANOVA seguido pelo teste t de Tukey. Em todas as análises, p≤0,05 foi considerado como indicativo de diferença estatística significante.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão de PROX1 nas SCC

A expressão de *PROX1* nas linhagens celulares SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25 foi avaliada por meio de qRT-PCR e *Western-blotting*. A figura 5.1A representa os níveis de expressão do gene *PROX1* nas quatro linhagens celulares descritas acima. Dentre as linhagens analisadas, a linhagem SCC-9 apresentou o menor nível de expressão de mRNA para o gene *PROX1*, sendo semelhante aos níveis de expressão encontrados na amostra calibradora (QON).

Foi também possível observar menor expressão da proteína *PROX1* na linhagem celular SCC-9 quando comparada com as demais linhagens analisadas (Figura 5.2B). No painel inferior da figura 5.2B, verificamos que a quantidade de proteínas presente em cada banda do gel foi equivalente, como mostrado com anticorpo contra β -actina.

Em decorrência da baixa expressão tanto de mRNA quanto dos níveis protéicos de *PROX1* na linhagem SCC-9, esta foi selecionada para a realização do ensaio de superexpressão.



Figura 5.1 - (A) Razão da expressão normalizada para o gene *PROX1* nas linhagens celulares SCC4, 9, 15 e 25 em relação à linhagem QON. (B) Western-blotting ealizado com proteínas extraídas das células SCC, utilizando anticorpo específico para PROX1 e β-actina. Pode-se observar menor expressão de mRNA e proteína *PROX1* na linhagem SCC-9 em relação às demais linhagens

5.2 Superexpressão do gene PROX1

A linhagem SCC9 foi transfectada com os vetores pCMV6 (controle) e pCMV6-PROX1. Após a seleção dos clones por meio do antibiótico G418, a expressão gênica de *PROX1* foi avaliada por qRT-PCR e e os níveis protéicos por *Western-blotting*. Após extração do RNA total dos clones celulares selecionados e avaliação de sua integridade (Figura 5.2A), este foi reversamente transcrito e utilizado na reação de qPCR com primers específicos para o gene *PROX1* e gene

constitutivo *HPRT*. Observou-se a superexpressão do gene *PROX1* nos clones celulares transfectados com o vetor pCMV6-PROX1 em relação aos clones controles e à linhagem SCC9 (Figura 5.2B). A produção protéica de *PROX1* nos clones celulares foi analisada por *Western-blotting*, no qual trinta microgramas de proteína foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. A figura 5.2C representa a reação de *Western-blot*ting para a proteína *PROX1*, na qual podemos observar maior expressão da mesma nos clones celulares SCC9-PROX1 em relação aos controles.

Três clones celulares que apresentaram maior expressão do mRNA e proteína do gene *PROX1* (SCC9-PROX1 C1, C2 e C3), um clone celular SCC9-pCMV6 e a linhagem SCC9 foram selecionados para a realização dos ensaios de proliferação celular, diferenciação, apoptose e *microarray*.



Figura 5.2 - (A) Gel de agarose 1% mostrando a integridade do RNA total utilizado no experimento de qRT-PCR. (B) Razão da expressão normalizada do gene *PROX1* na linhagem SCC9 e nos clones celulares transfectados com os vetores pCMV6 (controle) e pCMV6-PROX1. (C) Reação de *Western-blotting* anti-PROX1 realizado com extrato protéico obtido a partir dos clones celulares transfectados com os vetores acima. Foi evidenciada superexpressão do gene *PROX1* nos clones celulares SCC9-PROX1 comparado com a linhagem não transfectada (SCC9) e transfectada com o vetor controle.

5.3 Efeito da superexpressão do gene PROX1 sobre a proliferação celular

A participação do gene *PROX1* na proliferação celular foi avaliada por meio dos ensaios de curva de proliferação, citometria de fluxo, índice de incorporação de BrdU ao DNA e imunocitoquímica para Ki-67.

As curvas de proliferação foram realizadas nos três clones celulares superexpressando o gene *PROX1* (C1, C2 e C3), no clone celular controle (SCC9-pCMV6) e na linhagem SCC9. Ao trabalhar com os transfectantes estáveis, observou-se que os clones SCC9-PROX1 apresentaram potencial proliferativo significantemente menor quando comparados com o clone celular SCC9-pCMV6 e a linhagem SCC9 (p<0,05). Isto foi confirmado por três curvas de proliferação, nas quais as células foram cultivadas em placas de 24 poços, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer em intervalos de 24 horas, num período total de 144 horas. Os clones celulares SCC9-PROX1 mostraram menor crescimento celular em todos os períodos analisados (p<0,05). A linhagem SCC9 e o clone celular SCC9-pCMV6 se comportaram de maneira semelhante, não havendo diferença estatística entre as mesmas nos intervalos de tempo analisados (Figura 5.3).



Figura 5.3 - Resultado representativo de três curvas de proliferação celular, mostrando que os clones celulares SCC9 pCMV6-PROX1 C1, C2 e C3 apresentam menor potencial proliferativo em todos os períodos analisados quando comparados com a linhagem SCC9 e o clone celular SCC9-pCMV6, as quais apresentaram crescimento celular similar (* p<0.001; ** p<0.05)

Para avaliarmos o efeito da superexpressão do gene *PROX1* sobre o ciclo celular, as células foram semeadas em meio de cultura livre de FBS e sincronizadas por 48h. Após 24h de cultivo em meio com FBS, as células foram coletadas, fixadas em etanol 70% e incubadas com iodeto de propídeo. Como demonstrado na figura 5.4, houve uma porcentagem significantemente menor de células dos clones SCC9-PROX1 nas fases S/G2/M quando comparado com a linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6.



Figura 5.4 - Distribuição da linhagem SCC9 e clones celulares nas fases do ciclo celular, após sincronização em meio livre de soro e posterior crescimento em meio contendo 10% FBS por 24 horas. É possível observar uma menor porcentagem de células superexpressando *PROX1* nas fases S/G2/M, em comparação com os controles (* p<0,05)</p>

Na análise de incorporação de BrdU ao DNA e expressão imunocitoquímica de Ki-67, foram considerados positivos os núcleos corados em marrom, independente da intensidade. Pode-se observar uma redução significante no índice de proliferação dos clones celulares superexpressando o gene *PROX1* quando comparados com o controle (p<0,05; Figuras 5.5 e 5.6).

Os resultados obtidos por meio dos ensaios descritos acima demonstram que a superexpressão do gene *PROX1* na linhagem celular SCC9 promove redução da proliferação celular.



Figura 5.5 - (A) Imagem representativa da incorporação de BrdU na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) nos clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X).(C) Os resultados representam a média ± desvio padrão de células positivas em uma contagem de 1.000 células. Nota-se maior incorporação de BrdU na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 quando comparado com os clones celulares que apresentam superexpressão do gene *PROX1* (* p<0,05)</p>





Figura 5.6 - (A) Imagem representativa da reação imunocitoquímica para a linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X). (C) Os valores representam a média ± desvio padrão de células positivas em uma contagem de 1.000 células. Pode ser observada importante redução da proliferação celular nos clones celulares que apresentam superexpressão do gene *PROX1* (* p<0,05)</p>

5.4 Efeito da superexpressão do gene *PROX1* sobre a expressão de citoqueratinas

Citoqueratinas são proteínas do filamento intermediário encontradas no citoesqueleto de células epiteliais normais e tumorais. Pelo menos 20 citoqueratinas

já foram descritas na literatura, sendo sua expressão específica em determinados estágios da diferenciação epitelial normal. Alguns trabalhos têm demonstrado um aumento ou redução na expressão de algumas citoqueratinas, comumente expressas pela mucosa oral normal, durante a transformação maligna (Fillies et al., 2007; Toyoshima et al., 2009).

Desta maneira, foram realizadas reações imunocitoquímicas para as CKs 1, 13, 14, 16, 18 e 19, com a finalidade de avaliar se a superexpressão do gene *PROX1* promove alteração no padrão de expressão de citoqueratinas envolvidas com o ganho de diferenciação celular, uma vez que este gene participa do controle da diferenciação celular (Sosa-Pineda et al., 2000; Burke; Oliver 2002; Takahashi et al., 2006; Lavado; Oliver, 2007).

O padrão de expressão encontrado para a CK1 foi caracterizado por uma marcação citoplasmática homogênea, com intensidade discretamente maior na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 quando comparada com os clones celulares transfectados com o gene *PROX1* (Figura 5.7A e 5.7B), sendo a diferença na porcentagem de expressão estatísticamente significante (p<0,05; Figura 5.10A).

Os clones celulares SCC9-PROX1 avaliados, bem como os controles, apresentaram expressão homogênea e citoplasmática de CK10 (Figura 5.7C e 5.7D). Não houve diferença estatística significante na expressão desta citoqueratina nas células analisadas (Figura 5.10B).

A CK13 mostrou marcação citoplasmática intensa na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6, caracterizada pelo acúmulo de CK13 nas células localizadas na periferia das ilhas neoplásicas. Diferentemente, os clones celulares SCC9-PROX1 apresentaram marcação citoplasmática homogênea e discreta de CK13 (Figura 5.7E e 5.7F), havendo diferença significante da expressão de CK13 nestes clones celulares em relação aos controles (p<0,05; Figura 5.10C).

O padrão de marcação encontrado para a CK14 e CK16 foi semelhante, representado por uma marcação citoplasmática homogênea em todas as células (Figura 5.8A e 5.8B; Figura 5.8C e 5.8D), não havendo diferença estatística de marcação para estas citoqueratinas nos diferentes grupos celulares avaliados (Figura 5.10D e 5.10E).

A reação imunocitoquímica para as CK18 e CK19 mostrou intensa marcação citoplasmática para estas proteínas nas células controle em relação aos clones celulares SCC9-PROX1, os quais apresentaram um padrão de marcação focal e em menor intensidade (p<0,05; Figura 5.9A, 5.9B, 5.9C e 5.9D e Figura 5.10F e 5.10G). Observou-se uma marcação mais intensa ao redor do núcleo em algumas células marcadas para as CK18 e CK19 da linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6.



Figura 5.7 - Reação imunocitoquímica para CK1 (A) e (B), CK 10 (C) e (D), CK13 (E) e (F). (A), (C) e (E) correspondem a imagem representativa para a reação imunocitoquímica com os anticorpos descritos acima para a linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B), (D) e (F) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3. Houve maior expressão de CK1 e CK13 nas células controle quando comparado com os clones celulares SCC9-PROX1. Em detalhe, observa-se marcação intensa para CK13 nas células periféricas das ilhotas (C) (400X). Barra indicativa de 100um é mostrada nas imagens



Figura 5.8 - Reação imunocitoquímica para CK14 (A) e (B) e CK16 (C) e (D). (A) e
(C) correspondem a imagem representativa para a reação imunocitoquímica na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) e (D) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X). Pode-se observar uma marcação citoplasmática homogênea para as CK14 e CK 16 em todas as células



Figura 5.9 - Reação imunocitoquímica para CK18 (A) e (B) e CK19 (C) e (D). (A) e
(C) correspondem a imagem representativa para a reação imunocitoquímica na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 e (B) e (D) para os clones celulares SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 (100X). Houve intensa marcação citoplasmática para as CK18 e CK19 na linhagem SCC9 e SCC9-pCMV6 quando comparada com os clones celulares superexpressando o gene *PROX1*. (A) e (C) Em detalhe, observa-se padrão de marcação mais intenso ao redor no núcleo em algumas células (400X)



Figura 5.10 - Representação gráfica da expressão das citoqueratinas CK1 (A), CK10 (B), CK13 (C), CK14 (D), CK16 (E), CK18 (F) e CK19 (G) nos diferentes grupos celulares. Houve diferença estatística significante entre os clones SCC9-PROX1 e controle SCC9 e SCC9-pCMV6 para as CK1, CK13, CK18 e CK19 (* p<0,05)</p>

5.5 Efeito da superexpressão do gene PROX1 na morte celular

A taxa de morte celular dos clones celulares SCC9-PROX1 e controle foi avaliada por meio da marcação celular com Anexina V e iodeto de propídio em citômetro de fluxo. Na figura 5.11 podemos observar a representação gráfica da distribuição das células em Q1, correspondente às células em apoptose (positivas para Anexina V), Q3, células necróticas (positivas para iodeto de propídeo) e Q4, células vivas. Não observamos diferença significante entre o número de células em apotose e/ou necrose entre os clones celulares SCC9-PROX1 e controles (Figura 5.11 e Figura 5.12). Desta maneira, foi observado que a superexpressão do gene *PROX1* na linhagem celular SCC9 não promove alteração na taxa de apoptose.



Figura 5.11 – Histograma representativo da marcação celular com iodeto de propídio e anexina V para o clone celular SCC9-pCMV6 (A) e (B) e SCC9-PROX1 (C) e (D). Não observamos diferença na porcentagem de células em apotose e necrose entre os clones celulares avaliados. Q1= apoptose; Q2=apoptose tardia, Q3=necrose e Q4= células vivas



Figura 5.12 - Porcentagem de células positivas para anexina V (A) e iodeto de propídeo (B). Não houve diferença estatística significante na taxa de apoptose e/ou necrose entre a linhagem SCC9, clone SCC-pCMV6 e SCC9-PROX1 (p>0,05)

5.6 Experimento de microarranjo

5.6.1 Padrões de expressão gênica global entre as amostras analisadas

Para a análise de *microarray*, foram utilizados RNAs provenientes das amostras SCC9-pCMV6, SCC9-PROX1 Clone1(C1), Clone 2 (C2) e Clone 3 (C3), em duplicata, totalizando um total de 8 hibridações.

Em um primeiro momento avaliamos o perfil de expressão gênica global das amostras selecionadas. Com este propósito utilizamos um método de agrupamento não supervisionado, o agrupamento hierárquico, para a visualização dos dados. A clusterização hierárquica agrupa as amostra de acordo com a semelhança entre elas, ressaltando a semelhança entre as amostras idênticas (Figura 5.13). Observou-se que as réplicas agruparam-se duas a duas, com exceção da amostra SCC9-PROX1 C3, a qual apresentou maior variabilidade entre suas réplicas.



Figura 5.13 - Dendograma de agrupamento hierárquico. Dois clusters principais são formados, um deles contendo o clone SCC9-PROX1 C1 e o controle de transfecção, e o outro agrupando o clone SCC9-PROX1 C2 e C3. Amarelo: clones celulares SCC9-PROX1; vermelho: clone celular SCC9-pCMV6

A análise dos componentes principais de variação (PCA), a qual agrupa as amostras com base nas principais fontes de variabilidade foi também realizada em todas as amostras. Pode-se observar uma variabilidade nos padrões de expressão gênica entre as amostras que apresentam superexpressão do gene *PROX1*, entretanto, foi observada uma variação de expressão mais acentuada entre os clones celulares SCC9-PROX1 em relação ao controle SCC9-pCMV6 9 (Figura 5.14).

A variabilidade na expressão gênica representa uma combinação entre a variabilidade metodológica e a variação biológica inerente às amostras. Dentre as variáveis metodológicas, o tipo de ensaio escolhido, análise de expressão gênica por *microarrays*, traz consigo um número bastante grande de etapas que agregam variáveis à análise. Dentre essas etapas merecem destaque os processos de extração de RNA, avaliação da qualidade, armazenamento das amostras e protocolo experimental para a hibridação dos *arrays*. Quanto ao protocolo de hibridação dos *arrays*, todos os cuidados para a diminuição da variabilidade experimental foram executados, em particular ressaltamos a seleção de amostras com boa qualidade de RNA, a randomização na seleção da ordem das amostras hibridadas nos *arrays* e a realização das etapas experimentais para todas as amostras em um mesmo dia.



Figura 5.14 - PCA mostrando a projeção dos valores de expressão gênica obtidos por *microarrays* em três componentes principais de variabilidade. Cada esfera representa a expressão global de uma amostra. Cada cor representa um tipo de amostra. Azul: clones celulares SCC9-PROX1; vermelho: SCC9-pCMV6. Observa-se grande variabilidade na expressão gênica global das amostras, porém uma relativa semelhança das amostras superexpressando *PROX1* quando comparadas com a amostra controle, visualizadas através da distribuição das amostras no espaço

5.6.2 Análise de genes diferencialmente expressos entre os clones celulares SCC9-PROX1 e SCC9-pCMV6

Devido ao pequeno número de réplicas experimentais, optamos por avaliar os níveis de expressão e o *fold-change* em relação à amostra SCC9-pCMV6 utilizandose a média de expressão dos clones SCC9-PROX1 C1, C2 e C3, apesar da amostra SCC9-PROX1 C3 apresentar, pela análise de *microarray*, o maior nível de expressão do gene *PROX1* (Figura 5.15).



Figura 5.15 - Expressão do gene *PROX1* analisada por *microarray* nos clones celulares SCC9-pCMV6 e SCC9-PROX1. Observou-se que o clone celular SCC9-PROX1 C3 apresenta o maior nível de expressão de *PROX1* nas duas réplicas realizadas

A análise por *microarray* revelou 925 genes com expressão maior que 2 vezes e 789 genes com expressão menor que 2 vezes nos clones SCC9-PROX1 em relação ao controle (Anexo B). Para a avaliação do efeito global da superexpressão do gene *PROX1* nos diferentes processos celulares, os genes diferencialmente expressos foram agrupados de acordo com suas funções biológicas, utilizando-se o *Gene Ontology*. O projeto *The Gene Ontology* conforme descrito em sua página na *internet* (http://www.geneontology.org/) é uma iniciativa que tem como objetivo padronizar a representação de genes e seus produtos através de um vocabulário controlado que caracterize estes genes, fornecendo ainda ferramentas para acessar e processor este tipo de dado. Observou-se que dentre os processos celulares possivelmente afetados pela superexpressao de *PROX1*, desenvolvimento vascular e adesão celular aparecem com grande destaque, uma vez que foi observada diferença estatística significante após as análises de Bonferroni, Benjamini e FDR (p<0,05). Entretanto, outros processos celulares também foram identificados e a relação dos genes envolvidos nestes processos é descrita no Quadro 5.1 Segundo a

definição do *Gene Ontology*, desenvolvimento vascular consiste no processo que especifica a progressão da formação de vasos sanguíneos até o desenvolvimento de estruturas maduras. Adesão entre célula-célula e célula- substrato, como matriz extracelular, via moléculas de adesão, caracteriza o fenômeno de adesão celular.

Ontologia	Acesso GO	Genes
Desenvolvimento Vascular FDR: 0,006	GO:0001568	RTN4, NRP1, LMO2, S100A7, COL3A1, CDH2, TNFSF12, SRF, MMP2, GJA5, WT1, CITED2, T, ARHGAP22, HEY1, CTGF, ROBO1, ITGAV, CASP8, TGM2, GBX2, IL1B, THBS1, PPAP2B, C1GALT1, ANGPTL4, CYR61, TBX3, MYO1E, ESX1, ITGA4, CSRP3, PROX1, COL5A1, SLIT2, SMO, LAMA4, NOTCH1, EREG, LAMA5, COL1A2, AAMP, COL1A1, TNFAIP2
Adesão Celular FDR:0,01	GO:0007155	DLC1, MTSS1, NRP1, NPNT, BCAN, L1CAM, PCDHA1, CXADR, WISP2, CDH20, WISP1, CTGF, ROBO1, COL12A1, CYR61, RET, PCDHB8, MAGI1, PCDHB5, PCDHB6, ICAM2, BYSL, PCDHB2, LEF1, ACTN1, PCDH9, SIGLEC12, ACTN3, GPR98, NCAM1, CCR8, TNFAIP6, CX3CR1, GPR56, CLDN1, LAMC1, MFAP4, AOC3, DCBLD1, CLDN17, TNC, COL3A1, NINJ1, COL2A1, ITGB2, CDH2, NEO1, CD72, CCL5, CLDN14, ITGBL1, LY6D, COL7A1, PVRL1, ITGB8, TNR, COMP, ITGAV, FAT2, COL6A2, COL6A1, CD22, CD24, COL8A1, THBS1, SPAM1, COL8A2, FN1, FLRT3, OLR1, ADAM23, COL13A1, ITGA1, LGALS7, EFS, CELSR2, ITGA4, CELSR1, PCDH17, COL5A1, COL4A6, LAMA2, LAMA4, CDH16, LAMA5, CDH18, PECAM1, DSC2, DSC1, PDZD2, ABL2, FEZ1
Regulação da Apoptose	GO:0042981	DLC1, RTN4, IER3, PTGS2, WFS1, STAT5A, GPR109B, TUBB2C, SNCA, TLR2, JAG2, BNIP3, RPS27L, TNFSF12, CITED2, TIAM2, CASP8, IL1B, TMEM102, FAS, CASP1, DDAH2, LTB, IL1A, MAP2K6, NMNAT3, BCL2L14, CD3G, ACTN1, ACTN3, DAPK2, DAPK1, SMO, TNFRSF9, INHBA, SERPINB9, ADRB2, TNFRSF10B, BTG2, HIPK2, RIPK3, SERPINB2, FAIM3, KCNH8, NGFR, FGD2, C6, RAG1, SOX4, COL2A1, ASNS, BDKRB2, <i>TIMP3</i> , ADA, CD74, DPF1, MSX2, TUBB, ERCC6, COMP, ALDH1A3, PYCARD, TGM2, PCSK9, CD24, THBS1, NEFL, ANGPTL4, CFLAR, IL2RB, FOXL2, IL6, VAV3, TBX3, IL7, ITGA1, MAL, IGF2, GAS1, BIRC3, ADIPOQ, PLG, PPIF, NOTCH1, TNFSF10, SFRP1, EEF1E1, BIK, SST, IGFBP3, SMPD2, F2R, HDAC6

continua...
Ontologia	Acesso GO	Genes
Regulação da proliferação celular	GO:0042127	DLC1, FTMT, RARRES1, FOSL2, NRP1, PTGS2, STAT5A, EDN2, TACR1, PTGS1, PPARG, IL28RA, JAG2, TTK, TNFSF12, CXADR, SSR1, GLI1, WISP2, IL1B, DLG3, ASPH, LTB, IL1A, CDC6, PTGER2, IL27, TNFRSF14, PROX1, PDCD1LG2, PTHLH, SMO, HHEX, TNFRSF9, CTH, ADRB2, BTG2, EREG, ADM, FGFR1OP, HIPK2, ADAMTS1, NGFR, LAMC1, EIF2AK2, FGFR2, CSF3, CAV2, RBP4, FGFR4, FGFR3, NDN, SOX2, SOX4, BDKRB2, ADA, OTP, MSX2, T, RAC2, ZAP70, TGM2, PTN, LHX5, CD24, THBS1, RUNX2, PGGT1B, IL6, ESRRA, TBX3, TBX2, IL7, CRIP2, IL9, IGF2, SPARC, GAS1, FOXP3, PLG, NOTCH1, LAMA5, EEF1E1, ADRA1A, ID4, PBX1, FABP7, UTP20, IGFBP3, SST, F2R
Migração celular	GO:0016477	CAV2, NRTN, DRD1, NRP1, NDN, HMGCR, EDN2, S100A9, ITGB2, TNFSF12, CDH2, CCL5, SRF, SAA2, CTGF, ROBO1, SAA1, PRSS3, GBX2, IL1B, CD24, THBS1, PPAP2B, NR2F1, TWIST1, FN1, IL6, RET, VAV3, EMX2, ITGA1, <i>ITGA4</i> , COL5A1, SLIT2, SMO, LAMA5, AAMP, LAMC1
Motilidade celular	GO:0048870	DNAH11, CAV2, NRTN, DRD1, NEURL, NRP1, NDN, HMGCR, EDN2, S100A9, ITGB2, TNFSF12, CDH2, CCL5, SRF, SAA2, CTGF, ROBO1, SAA1, PRSS3, GBX2, IL1B, CD24, THBS1, PPAP2B, NR2F1, TWIST1, FN1, IL6, RET, VAV3, EMX2, ITGA1, <i>ITGA4</i> , COL5A1, SLIT2, SMO, LAMA5, AAMP, LAMC1
Diferenciação celular	GO:0045597	ZNF488, STAT5A, SOX2, PPARG, MORF4L2, CCL5, SRF, HLA-DMA, CD74, ADA, OTP, ROBO1, NKX6-2, JUND, ZAP70, RUNX2, NEFL, IL6, IL7, IGF2, SLIT2, SMO, INHBA, NOTCH1, NGFR, CA2, IGFBP3

Quadro 5.1 - Informações dos processos biológicos baseado no *Gene Ontology* para os genes diferencialmente expressos revelados pelos dados da análise de *microarray*

Apesar de não estarem incluídos no agrupamento gerado pelo *Gene Ontology* em relação à proliferação celular, procuramos analisar também a expressão dos genes *CCNE1* (ciclina E), *CCNA1* (ciclina A), *CDKN1A* (p21), *CDKN1B* (p27) e *CDKN1C* (p57) por *microarray* entre os clones SCC9-PROX1 e controle, relatados na literatura como sendo regulados pelo gene *PROX1* (Tabela 5.1). Não encontramos alteração na expressão destes genes entre os clones SCC9-PROX1 e controle na análise de expressão por *microarray* (fold change $-2 \le 1 \ge 2$, Tabela 5.1).

Genes	Descrição	Fold-change
CCNE1	Ciclina E1	1.12
CCNA1	Ciclina A1	1.13
CDKN1A	Inibidor de ciclina dependente de quinase 1A	-1.20
CDKN1B	Inibidor de ciclina dependente de quinase 1B	- 1.02
CDKN1C	Inibidor de ciclina dependente de quinase 1C	1.34

Tabela 5.1 - Descrição dos genes relacionados com proliferação celular e seus respectivos fold-change após análise de expressão do *microarray*

5.6.3 Seleção e validação dos resultados de expressão do microarray por qRT-PCR

Baseando-se no agrupamento descrito acima, foram selecionados os genes alguns genes *MMP1*, *MMP2*, *TIMP3* e *ITGA4* para validação dos resultados do microarray por qRT-PCR, uma vez que participam dos processos celulares descritos acima. Além disso, apesar dos transcritos *HOXD3* e *MEIS3* não se enquadrarem no fold-change estabelecido quando avaliados nos clones SCC9-PROX1 em relação ao controle, estes foram também selecionados por participarem dos processos celulares afetados na carcinogênese e pela sua disponibilidade em nosso laboratório (Tabela 5.2).

Como pode ser observado na tabela 5.2 e nas figuras 5.16 e 5.17, os genes *HOXD3*, *MEIS3*, *ITGA4*, *MMP2* e *TIMP3* apresentaram redução de expressão nos clones celulares SCC9-PROX1 quando comparados com o controle de transfecção SCC9-pCMV6. Nos gráficos de expressão para os genes descritos acima, podemos observar a variabilidade de expressão entre as mesmas amostras na duplicata experimental. Porém, apesar da variabilidade, os clones celulares SCC9-PROX1 se comportaram de maneira semelhante (redução da expressão). O gene *MMP1* apresentou maiores níveis de expressão nos clones celulares SCC9-PROX1 em relação ao controle (Tabela 5.2 e Figura 5.17).

Genes	Descrição	Fold-change
MEIS3	Meis hoemobox 3	- 1.60
HOXD3	Homeobox D3	- 1.69
ITGA4	Integrina alfa 4	- 2.34
MMP2	Matriz metalopeptidase 2	- 2.51
TIMP3	Inibidor de metalopeptidase 3	- 3.05
MMP1	Matriz metalopeptidase 1	+ 2.11

Tabela 5.2 – Descrição dos genes selecionados para validação por qRT-PCR e seus respectivos *fold-change* após análise de expressão do *microarray*



Figura 5.16 - Expressão dos genes *HOXD3*, *MEIS3* e *ITGA4* no clone celular controle (SCC9-pCMV6) e SCC9-PROX1 por *microarray*. Nota-se expressão reduzida destes genes nos clones celulares superexpressando o gene *PROX1*, apesar da variabilidade de expressão encontrada para o mesmo clone na duplicata experimental



Figura 5.17 - Expressão por dos genes *MMP2*, *TIMP3* e *MMP1* no clone celular controle (SCC9-pCMV6) e SCC9-PROX1 obtidos por *microarray*. Nota-se menor expressão dos genes *MMP2* e *TIMP3* nos clones celulares superexpressando o gene *PROX1*. Em relação ao gene *MMP1*, houve maior expressão nas células SCC9-PROX1 quando comparado ao controle

Para validação dos resultados de expressão do *microarray*, cDNA proveniente das amostras SCC9-PROX1 C1, C2 e C3 e o clone celular controle foram submetidas à reação de qRT-PCR utilizando-se primers específicos para os genes *ITGA4*, *MMP1*, *MMP2*, *TIMP3* descritos acima, assim como *MEIS3*, *HOXD3*, e o gene constitutivo *HPRT*. Para a análise de expressão, a amostra SCC9-pCMV6 foi utilizada como amostra calibradora. Nível de expressão maior que 1 e menor que -1 foram considerados para a validação dos genes hiperexpressos e hipoexpressos, respectivamente.

A tabela 5.3 representa os valores de *fold-change* e média de expressão encontrada por qRT-PCR para cada gene selecionado para validação dos resultados de *microarray*. Houve validação dos resultados de expressão do *microarray* por qRT-PCR para os genes *MEIS3, HOXD3, MMP2* e *TIMP3*, os quais apresentaram expressão reduzida nos três clones celulares SCC9-PROX1 avaliados (Tabela 5.3 e Figura 5.17). Além disso, o gene *MEIS3* e *TIMP3* apresentaram menores níveis de expressão no clone celular SCC9-PROX1 C3, provavelmente em decorrência deste clone ter apresentado, na análise de *microarray*, maiores níveis de expressão de *PROX1* (Figura 5.17). Foi observada maior expressão da *MMP1* nos clones celulares superexpressando o gene *PROX1* em relação ao controle, confirmando os dados de expressão por *microarray*. Em relação ao gene *ITGA4*, não observamos redução menor que -1 na expressão deste gene nos clones celulares SCC9-PROX1 e portanto, não houve validação dos resultados obtidos no *microarray* (Tabela 5.3 e Figura 5.18).

Tabela 5.3 – Comparação da expressão dos valores de expressão obtidos para os genes selecionados na análise de *microarray* e qRT-PCR. Os valores representam a média de expressão dos clones celulares SCC9-PROX1 em relação ao controle SCC9-pCMV6.

Gene	Fold-change (microarray)	Razão da Expressão (qRT-PCR)		
MEIS3	- 1,60	-2,9		
HOXD3	- 1,69	-1,55		
ITGA4	- 2,34	-0,75		
MMP2	- 2,51	-2,55		
TIMP3	- 3,05	-2,02		
MMP1	+ 2,11	+2,72		



Figura 5.18 - Razão da expressão normalizada por qRT-PCR para os genes MEIS3, HOXD3, ITGA4, MMP2, TIMP-3 e MMP1. Foi observado níveis reduzidos de expressão para os gene MEIS3, HOXD3, MMP2 e TIMP-3 nos três clones celulares analisados em relação ao controle SCC9-pCMV6. Não houve validação da hipoexpressão do gene ITGA4. O gene MMP1 apresentou-se superexpresso em todos os clones celulares SCC9-PROX1. De acordo com os resultados acima, houve validação parcial dos dados de expressão do microarray

6 DISCUSSÃO

Os genes homeobox participam da regulação de vários mecanismos biológicos cruciais para a célula como: estabelecimento da identidade celular de acordo com os sinais determinados pelo microambiente, o controle do crescimento e da proliferação celular por meio da interação com proteínas que regulam o ciclo celular e as vias de apoptose, o processo de comunicação célula-célula por meio da indução de fatores de crescimento, citocinas e vias de sinalização intracelular, e o controle do padrão ântero-posterior durante o desenvolvimento embrionário (Samuel; Naora, 2005; Abate-Shen, 2002). Dentre os genes homeobox, o gene *PROX1* têm sido atualmente alvo de muitos estudos que visam analisar a expressão e participação deste gene no desenvolvimento e /ou progressão tumoral de diferentes neoplasias (Dudas et al., 2008; Shimoda et al., 2006; Elsir et al., 2010; Elsir et al., 2011).

O gene *PROX1* é expresso de maneira específica em diferentes tecidos e portanto, sua expressão pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento, órgão e tipos de neoplasia. De fato, alguns trabalhos já demonstraram que a perda de expressão deste gene está associada com o desenvolvimento de linfomas (Nagai et al., 2003), tumores de pâncreas (Takahashi et al., 2006), mama (Versmold et al., 2007) e fígado (Shimoda et al., 2006; Dudas et al., 2008). Por outro lado, observouse que este gene encontra-se altamente expresso em gliomas malignos (Elsir et al., 2010; Elsir et al., 2011), câncer de cólon (Petrova et al., 2008) e neoplasias hematológicas (Dadras et al., 2008). Como observado, a participação do gene *PROX1* em diferentes neoplasias é altamente dependente de seu tecido de origem.

Os principais mecanismos responsáveis pela perda de expressão do gene *PROX1* em neoplasias, constituem hipermetilação de sua região promotora, mutações pontuais do DNA e também na molécula de mRNA (Nagai et al., 2003; Takahashi et al., 2006; Versmold et al., 2007). Em geral, independente da origem da neoplasia, uma elevação ou uma redução (ou ausência) na expressão do gene *PROX1* altera o fenótipo e o comportamento celular, com conseqüências deletérias para a célula, resultando na reversão celular para um estado indiferenciado, promoção da sobrevivência e proliferação celular e favorecimento da transformação maligna e/ou a progressão tumoral (Samuel; Naora, 2005). Acredita-se que este gene também participe na formação de metástases, uma vez que seu níveis de

expressão se mostraram reduzidos em tumores metastáticos em relação aos tumores primários (Versmold et al., 2007) e estão ainda associados com a neoformação vascular.

Recentemente, a expressão deste gene foi estudada em amostras de carcinoma epidermóide bucal pareadas com sua respectiva margem (Rodini, 2008). Observou-se que o gene *PROX1* apresenta níveis reduzidos de expressão nas amostras de carcinoma epidermóide bucal em relação ao tecido normal. Entretanto, não se sabe qual o papel específico desempenhado por este gene durante o desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal. Desta maneira, realizamos a superexpressão do gene *PROX1* na linhagem celular SCC9, a qual apresenta níveis reduzidos de mRNA e proteína *PROX1*, a fim de investigar a participação deste gene em processos celulares crucias relacionados com a oncogênese, como proliferação, diferenciação e apoptose. Adicionalmente, verificamos o perfil de expressão gênica na linhagem SCC9 com superexpressão do gene *PROX1*, em busca de quais genes estariam possivelmente sendo regulados por este fator de transcrição.

Em relação à proliferação celular, observamos que a superexpressão do gene PROX1 promoveu a redução significante da proliferação, como verificado pela redução do índice de incorporação de BrdU ao DNA e da expressão de Ki67 nas células com superexpressão deste gene, bem como pelas curvas de proliferação e ciclo celular, no qual foi observado maior número de células análise de superexpressando o gene PROX1 na fase G1 quando comparado com as células controle. Estudos funcionais realizados em populações celulares da retina mostraram que o gene PROX1 participa de maneira relevante determinando a parada do ciclo celular em células precursoras da retina. Adicionalmente, Wigle et al. (1999) observaram uma baixa expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular em camundongos knockout para o gene PROX1, incluindo p27 e p57. Li e Vassin (2000) mostraram que os genes da família prospero, incluindo PROX1, atuam de maneira importante na organogênese, na qual controlam a transição de células mitoticamente ativas para células com diferenciação terminal. Neste contexto, os autores verificaram a desregulação de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular, dentre elas ciclina A e E, resultando em proliferação celular descontrolada. Entretanto, o conhecimento sobre a participação do gene PROX1 em relação à proliferação celular em neoplasias é bastante escasso.

Em corcodância com os achados do presente estudo, linhagens celulares derivadas de carcinoma hepatocelular submetidas à superexpressão do gene *PROX1* revelaram redução da proliferação celular enquanto sua inibição por meio de RNAi foi capaz de promover o ganho de proliferação (Shimoda et al., 2006). Por outro lado, Dadras et al. (2008) mostraram que a superexpressão do gene *PROX1* não interferiu com a proliferação celular em linhagem celular derivada de hemangiendotelioma mas foi capaz de promover um fenótipo mais agressivo, caracterizado por anaplasia celular e maior invasão à camada muscular de tumores formados em camundongos *nude*. Provavelmente, estes resultados divergentes em relação à proliferação celular associada com a superexpressão de *PROX1* sejam decorrentes do tipo celular específico e comportamento distinto em resposta ao estímulo gerado por este gene. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o ganho de expressão do gene *PROX1* em carcinoma epidermóide bucal está associada com seu menor potencial proliferativo.

Em relação ao tecido epitelial propriamente dito, citoqueratinas constituem filamentos intermediários expressos exclusivamente por células epiteliais, sendo diferencialmente expressas de acordo com os tipos de epitélio. Existem duas subfamílias de citoqueratinas, as quais são divididas de acordo com seu respectivo peso molecular: citoqueratinas tipo I (40-56.5kD) e tipo II (53-67kD), sendo que cada epitélio expressa pares específicos de citoqueratinas tipo I e II (Presland; Jurevic, 2002). No epitélio estratificado, células em diferenciação sintetizam uma sequência específica de citoqueratinas à medida que migram em direção à camada superficial. Desta maneira, a expressão de CK5 e CK14 é comumente encontrada na camada basal e está estritamente associada com o potencial proliferativo das células basais (Presland; Jurevic, 2002). Citoqueratinas 4 e 13 distribuem-se homogeneamente pelas camadas suprabasais, com expressão ocasional em células basais (Bloor et al., 2001) enquanto as células das camadas intermediárias mostram expressão adicional de CK1 e CK10, as quais representam sinais de diferenciação celular. As CK8 e CK18 não são comumente encontradas no epitélio estratificado maduro e a CK19 é expressa heterogeneamente na camada basal do epitélio escamoso estratificado (Van der Veldeb et al., 1999).

Em geral, o padrão de expressão das citoqueratinas é bastante conservado e alterações neste padrão de expressão refletem mudanças substanciais nas propriedades celulares (Bloor et al., 2001). Assim, muitos trabalhos têm demonstrado diferenças no padrão de citoqueratinas em epitélio oral normal, displasias e carcinoma epidermóide bucal.

Como o gene *PROX1* participa na determinação da diferenciação celular em diversos tecidos, o efeito de sua superexpressão também foi avaliado em relação à expressão de citoqueratinas, dentre elas, CK1, CK10, CK13, CK14, CK16, CK18 e CK19.

Houve redução significante da expressão de CK1 nos clones celulares superexpressando o gene PROX1 em relação ao controle. Em relação à CK10, não foi observada diferença significante na expressão da citoqueratina CK10 entre controle e células superexpressando o gene PROX1, a qual foi caracterizada por uma marcação citoplasmática homogênea. Sabe-se que a perda de expressão de CK1 e CK10 está associada com o grau de displasia epitelial, sendo sua expressão reduzida no carcinoma epidermóide bucal em relação às lesões leucoplásicas e displasias epiteliais da cavidade oral (Fillies et al., 2007). Adicionalmente, carcinomas epidermóides bem e moderadamente diferenciados expressam níveis variados destas citoqueratinas, localizadas principalmente em células epiteliais das ilhas tumorais (Bloor et al., 2001). Por outro lado, tumores pouco diferenciados não expressam CK1 e 10, de maneira que estas citoqueratinas representam marcadores de diferenciação celular (Bloor et al., 2001). Entretanto, Fillies et al. (2006) não encontraram correlação entre tumores positivos e negativos para estas citoqueratinas em relação a tamanho e diferenciação tumoral, envolvimento de linfonodos e sobrevida. De acordo com os trabalhos acima, as CK1 e 10 estão associadas com a diferenciação do carcinoma epidermóide bucal, entretanto, baseando-se em nossos resultados, a expressão destas duas citoqueratinas não é regulada pelo gene PROX1.

Interessantemente, houve redução da expressão de CK13 na linhagem SCC9-PROX1 quando comparado com o controle. Neste, a marcação citoplasmática se caracterizou por uma expressão intensa de CK13 nas células periféricas das ilhotas. Mikami et al. (2011) demonstraram marcação intensa de CK13 em áreas altamente queratóticas de carcinomas epidermóides bem diferenciados. Nestes tumores, mantém-se a expressão de CK13, juntamente com a síntese de CK1 e 10. À medida que o tumor se torna menos diferenciado, ocorre à substituição gradual de CK13 por CK1 e CK10, sendo a expressão destas citoqueratinas totalmente ausente em tumores pouco diferenciados. Provavelmente, devido à perda de estratificação

epitelial em tumores pouco diferenciados, o padrão de expressão de citoqueratinas é alterado e revertido a um estado mais simples.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o gene *PROX1* reduz a expressão de CK13, considerada um marcador de diferenciação celular em carcinoma epidermóide bucal, podendo então estar associado com tumores pouco diferenciados. Porém, é importante ressaltar que a CK13 é constitutivamente expressa no tecido normal, local no qual foi encontrada superexpressão de *PROX1* em relação ao tumor em estudo prévio (Rodini, 2008). Assim, acreditamos que provavelmente, este resultado contraditório seja decorrente das condições experimentais *in vitro*, as quais não mimetizam o ambiente tumoral de maneira fidedigna, não estando sujeita às interferências geradas pelo microambiente tumoral. O estudo imunoistoquímico para análise de expressão de *PROX1* e CK13 em amostras de carcinoma epidermpoide bucal deve ser conduzido com a finalidade de se elucidar e validar os resultados descritos acima.

Silveira et al. (2007) mostraram marcação citoplasmática homogênea de CK14 em todas as células neoplásicas do carcinoma epidermóide bucal, com exceção de algumas células mais invasivas. Em relação à CK16, os mesmo autores observaram correlação da imunoexpressão desta citoqueratina com estágio III e IV e também com pior prognóstico, sugerindo que a CK16 representa um marcador biológico do comportamento e agressividade tumoral. Além disso, a ausência de expressão de CK14 e CK16 em linhagens celulares derivadas de linfonodos metastáticos de carcinoma epidermóide sugerem que a perda de expressão destas citoqueratinas esteja associada com alterações estruturais da célula que favorecem a aquisição do fenótipo invasivo (Morifuji et al., 2000). Apesar da evidente participação destas citoqueratinas no desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal, não encontramos alteração na expressão de CK14 e CK16 nas células superxpressando o gene *PROX1* em relação aos controles. Houve uma marcação citoplasmática homogênea e semelhante em todas as células analisadas e, portanto, o gene *PROX1* não interferiu com a expressão destas citoqueratinas.

A citoqueratina 18 é expressa em todas as células epiteliais simples, na qual executa várias funções regulatórias, incluindo modulação da localização, transporte e síntese de proteínas específicas. Sua expressão é ausente no tecido epitelial pavimentoso estratificado, embora no carcinoma epidermóide bucal, esta citoqueratina encontre-se expressa de maneira aberrante (Fillies et al., 2006). Neste

trabalho, a superexpressão de PROX1 na linhagem SCC9 foi capaz de promover acentuada redução na expressão de CK18. Estudos recentes já demonstraram que a expressão desta citoqueratina em carcinoma epidermóide bucal está associada à patogênese e progressão desta neoplasia (Fillies et al., 2007). A superexpressão de CK18 em células epiteliais orais resulta em significante alteração da morfologia celular e aumento da motilidade, requisitos essenciais para o comportamento tumoral invasivo (Raul et al., 2004). Adicionalmente, verificou-se que o ganho de expressão de CK18 foi capaz de promover maior proliferação, crescimento em soft ágar e em meio livre de soro, bem como formação de tumores primários e metástases pulmonares quando injetadas em camundongos imunocomprometidos. Alam et al. (2011) mostraram que a CK18 promove a transformação maligna de células epiteliais, desempenhando papel importante nos mecanismos de invasão e metátase possivelmente por meio da modulação da sinalização celular via integrina β4, cuja expressão está relacionada a tumores agressivos da cavidade oral. Além disso, expressão de CK18 está associada com resistência a apoptose em células epiteliais (Gilbert et al., 2001). Fillies et al. (2006) analisaram a expressão de CK18 em 308 amostras de carcinoma epidermóide bucal e encontraram que a alta citoqueratina está associada expressão desta com tamanho tumoral. comprometimento linfonodal e menor sobrevida global. Uma vez que no presente trabalho foi observada redução na expressão de CK18 nos clones celulares superexpressando o gene PROX1, possivelmente, no carcinoma epidermóide bucal, a expressão desta citoqueratina é influenciada por este transcrito. Desta maneira, o gene PROX1 pode favorecer na aquisição do comportamento menos agressivo desta neoplasia.

Outra citoqueratina expressa somente em epitélio simples corresponde à CK19, a qual tem sido relatada como presente de maneira heterogênea na camada basal do epitélio estratificado normal. No carcinoma epidermóide bucal, as camadas suprabasais do epitélio bem como as células invasivas apresentam positividade para CK19. No entanto, muitos estudos têm demonstrado uma variação de células CK19 positivas no carcinoma epidermóide de 29 a 100% (Vora et al., 2003). Zhong et al. (2006), mostraram alta expressão do transcrito CK19 em amostras de carcinoma epidermóide bucal em relação ao tecido normal e ainda, gradativo aumento de CK19 foi observado de acordo com a diferenciação tumoral, sendo tumores pouco diferenciados altamente positivos para CK19. Os mesmos autores encontraram

ainda que o aumento de expressão dos níveis de mRNA e proteína CK19, tanto no carcinoma epidermóide bucal quanto na margem, está correlacionado não somente com diferenciação tumoral como descrito anteriormente, mas também com maior taxa de recorrência quando expressa na margem e menor sobrevida (Zhong et al., 2007). A redução progressiva na taxa de sobrevida de acordo com o ganho de expressão de CK19 em carcinoma epidermóide bucal também foi evidenciada por Fillies et al. (2006). Além disso, o ganho de expressão de CK19 parece ser um evento comum em lesões displásicas sendo comumente interpretado como evidência de uma desregulação da diferenciação epitelial. Neste estudo, a superexpressão do gene *PROX1* resultou na redução de expressão de CK19, a qual está diretamente relacionada não somente com diferenciação tumoral, mas também com maior agressividade tumoral e menor sobrevida. Baseando-se nos achados de que a superexpressão de *PROX1* promove redução na expressão das citoqueratinas 18 e 19, podemos concluir que este gene pode contribuir para uma maior diferenciação tumoral e fenótipo menos agressivo do carcinoma epidermóide bucal.

Sabe-se que gene *PROX1* atua favorecendo a diferenciação celular, importante durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção da especificidade celular na vida adulta. Na literatura, existem dois trabalhos relacionando a expressão do gene *PROX1* com diferenciação tumoral. Shimoda et al. (2006) observaram que amostras de carcinoma hepatocelular bem diferenciado apresentaram altos níveis de expressão de *PROX1*, havendo redução gradativa de expressão em tumores moderadamente e pouco diferenciados. Além disso, pacientes portadores de tumores com alta expressão de *PROX1* apresentaram prognóstico mais favorável em relação aos tumores com baixa expressão de *PROX1*. Tanto elevados quanto reduzidos níveis de expressão de *PROX1* foram observados em linhagens celulares derivadas de carcinoma pancreático bem diferenciado e pouco diferenciado, respectivamente (Schneider et al., 2005). Adicionalmente, tumores pancreáticos com baixa expressão de *PROX1* também apresentaram pior prognóstico, assim como observado em carcinoma hepatocelular.

Embora Rodini (2008) tenha encontrado maior expressão de *PROX1* nas margens em relação ao tecido tumor, não houve associação entre os níveis de expressão de *PROX1* nos tumores e parâmetros clínicos. É possível que o número de casos utilizados para análise de expressão por qRT-PCR não tenha sido suficiente para esta análise, e portanto, estudos utilizando um número representativo

de amostras de carcinoma epidermóide bucal pareados com sua respectiva margem devem ser conduzidos a fim de elucidar a participação deste gene na diferenciação desta neoplasia. Adicionalmente, a análise de tumores *in vivo* resultantes da inoculação de células superexpressando o gene *PROX1* também pode fornecer informações relevantes quanto à diferenciação tumoral e também expressão das citoqueratinas avaliadas neste trabalho, com destaque para as citoqueratinas 18 e 19.

A participação do gene PROX1 no processo de apoptose não é bem conhecida ainda na literatura. Wigle et al. (1999) demostraram que a progressão da diferenciação terminal de fibras celulares da retina e a formação de filamentos necessários para a formação do cristalino é dependente da expressão de PROX1. Camundongos knockout para este gene falham em produzir filamentos, não polarizam e migram adequadamente resultando na formação de cristalino oco. Os autores observaram um aumento da morte celular programada em células posteriores do cristalino, sugerindo que alteração na expressão do gene PROX1 promove falha de diferenciação terminal destas células, as quais entram em apoptose. Entretanto, não se sabe por quais mecanismos o gene PROX1 promove alteração da morte celular. Na literatura, a participação do gene PROX1 na apoptose ainda não foi demonstrada em células neoplásicas. No presente estudo, não observamos diferenças em relação ao número de células positivas para anexina-V e iodeto de propídeo em células superexpressando o gene PROX1 em relação ao controle. Provavelmente, no carcinoma epidermóide bucal, embora o gene PROX1 tenha um papel claro na diminuição da proliferação celular, este gene não interfere nos mecanismos de apoptose.

Para analisarmos quais os possíveis genes estariam diferencialmente expressos em decorrência da superexpressão do gene *PROX1*, realizamos o experimento de *microarray*. Os *microarrays* permitem a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes, tendo sido largamente utilizados em experimentos projetados para estudar as funções e as interações de genes dentro de um contexto global. Desta maneira, é possível se determinar padrões de expressão diferencial, comparando diferenças nos níveis de mRNA entre células submetidas a diferentes estímulos ou entre diferentes tipos celulares ou estágios de desenvolvimento.

Observamos pela análise do PCA, a qual agrupa as amostras com base nas principais fontes de variabilidade, que houve variação entre uma mesma amostra na

duplicata experimental. Entretanto, todos os clones com superexpressão do gene *PROX1* se comportaram de maneira similar, com variação de expressão acentuada em relação ao controle. Esta variabilidade na expressão gênica é esperada, e resulta de uma combinação entre a variabilidade metodológica e variação biológica inerente as amostras. Assim, em decorrência da variação de expressão do gene *PROX1* entre os clones SCC9-PROX1, optamos por utilizar a média de expressão dos genes diferencialmente expressos, pois acreditamos que desta maneira, estaríamos representando mais fidedignamente a participação do gene *PROX1* na regulação da expressão de diferentes genes.

Em trabalho realizado por Wigle et al (1999), houve redução na expressão das proteínas p27 e p57 em camundongos *knockout* para o gene *PROX1*, resultando no aumento de proliferação e desregulação do equilíbrio necessário entre células epiteliais ativas mitoticamente e células terminais diferenciadas não proliferativas durante o desenvolvimento da estrutura ocular. Desta maneira, os autores demostraram que a perda de expressão do gene *PROX1* está relacionada com ganho de proliferação, provavelmente pela desregulação destas proteínas. Sendo assim, em um primeiro momento, os dados obtidos por *microarray* foram analisados em relação aos níveis de expressão dos genes relatados na literatura como sendo regulados pelo gene *PROX1*, dentre eles *CDKN1B* (p27) e *CDKN1C* (p57), bem como genes importantes para o controle do ciclo celular, dentre eles *CDKN1A* (p21), *CCNE1* (ciclina E), *CCNA1* (ciclina A). Contudo, não foi observada alteração na expressão do gene *PROX1* promove redução da proliferação celular.

É importante ressaltar que a participação do gene *PROX1* em diferentes processos celulares é altamente dependente do tipo celular e estágio de desenvolvimento, bem como tipo de neoplasia. Portanto, apesar de se ter conhecimento da influência do gene *PROX1* nas proteínas p27 e p57 durante o desenvolvimento embrionário, os resultados deste trabalho sugerem que este gene não atua por meio destas proteínas no controle da proliferação celular no carcinoma epidermóide bucal, cujo cenário é totalmente diferente daquele encontrado no desenvolvimento. Além disso, foi realizada a interferência de apenas um gene em um momento celular específico e desta maneira, os genes de interesse podem ou não estar alterados, uma vez que a célula neoplásica pode utilizar diferentes vias

para compensar a perda ou ganho de expressão de determinado gene. Um dos mecanismos pelo qual o gene *PROX1* pode estar alterando a proliferação celular é por meio da regulação de proteínas associadas com adesão celular, cujo processo foi significantemente afetado pela superexpressão de *PROX1* no presente estudo, uma vez que muitas das proteínas envolvidas com adesão celular também participam de vias de sinalização importantes que regulam proliferação.

Outros genes relacionados com proliferação celular, incluindo fatores de crescimento e seus respectivos receptores, moléculas de vias de sinalização intracelular, interleucinas e fatores de transcrição foram identificados como diferencialmente expressos nos clones celulares SCC9-PROX1, sendo necessária a realização da validação da expressão de outros genes para melhor entendimento de quais genes afetados por *PROX1* estão favorecendo o ganho de proliferação no carcinoma epidermóide bucal.

Posteriormente, foi realizado o agrupamento tanto dos genes hiperexpressos como hipoexpressos obtidos na análise por *microarray*, por meio do banco de dados *Gene Ontology*, em busca de quais processos celulares, além de proliferação e diferenciação celular, estariam sendo influenciados pelo gene *PROX1* por meio da alteração da expressão gênica. O impacto da superexpressão do gene *PROX1* em diferentes processos biológicos foi então avaliada, revelando forte participação deste gene nos processos de desenvolvimento e adesão celular.

A participação do gene *PROX1* durante o desenvolvimento embrionário é bastante conhecida, principalmente por ser considerado um dos principais genes associados com o desenvolvimento do sistema linfático (Hong et al., 2002; Hong; Detmar 2003). Atua ainda determinando a especificidade celular em diferentes tecidos, incluindo sistema nervoso central, fígado, pâncreas e cristalino (Sosa-Pineda et al., 2000; Burke; Oliver 2002; Lavado; Oliver, 2007). Recentes estudos têm demonstrado que a superexpressão transiente do gene *PROX1* em células vasculares endoteliais promove a expressão de genes associados com a diferenciação linfática e redução da expressão de genes envolvidos com a manutenção do fenótipo vascular sanguíneo. Portanto, *PROX1* é capaz de promover a programação linfática da célula endotelial vascular (Hong et al., 2002). Em decorrência da relevante participação deste gene no desenvolvimento vascular, sua participação na regulação de genes associados com este processo já era esperada nos clones celulares SCC9-PROX1. Embora não se saiba qual a função específica

deste gene no carcinoma epidermóide em relação ao desenvolvimento vascular, podemos sugerir que a perda de expressão do gene *PROX1* possa promover a formação de estruturas vasculares sanguíneas ao invés de induzir a diferenciação linfática, contribuindo para o crescimento tumoral e metástase via hematogênica. De fato, a ausência de expressão do gene *PROX1* foi maior em tumores cerebrais metastáticos de mama em relação aos tumores primários, participando assim da progressão tumoral (Versmold et al., 2007).

Dentre os genes relacionados com desenvolvimento, selecionamos os genes HOXD3 e MEIS3 para validação por RT-qPCR. O gene MEIS3 constitui um importante cofator, fundamental para que haja a ligação específica dos gene HOX em sequências alvo do DNA (Moens; Selleri, 2006). Em relação ao gene HOXD3, foi observado que a superexpressão deste gene resulta na perda de expressão de Ecaderina e indução da expressão de N-caderina, contribuindo para o fenótipo metastático e invasivo de células derivadas de câncer de pulmão (Hamada et al., 2001). Juntamente com a expressão destes genes (HOXD3 e N-caderina), há um aumento concomitante na expressão de metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e fator ativador de plasminogênio (uPA), enzimas em íntima associação com os processos de angiogênese e invasão tumoral (Hazan et al., 2000). A expressão de HOXD3 induz também a expressão de integrina α 5 β 3 e dos ativadores de plasminogênio, os quais controlam a degradação de matriz extracelular (Maroulakou; Spyropoulos, 2003; Grier et al., 2005). Por meio de tecnologia antisense foi demonstrado que HOXD3 controla a migração e invasão de células do melanoma humano (Okubo et al., 2002).

Interessantemente, a superexpressão de *HOXD3* promove também uma redução na expressão de genes associados à estrutura dos desmossomos, favorecendo desta forma a dissociação e migração das células neoplásicas (Miyazaki et al., 2002). A expressão de *HOXD3* nas células endoteliais parece regular seletivamente a expressão de genes que contribuem para a remodelação da matriz extracelular durante a angiogênese (Boudreau et al., 1997). Este gene é ainda necessário para o processo angiogênico normal e sua expressão prolongada ou em excesso pode provocar a manutenção do fenótipo ativo/invasivo das células endoteliais e interferir com a remodelação vascular (Boudreau et al., 1997). Além disso, Hassan et al. (2006) mostraram que o gene *HOXD3* está superexpresso em amostras de carcinoma epidermóide em relação à margem. Neste trabalho,

observamos redução da expressão de *HOXD3* e *MEIS3* nos clones celulares superexpressando o gene *PROX1*, tanto na análise por *microarray* quanto RTqPCR. Desta maneira, podemos sugerir que o gene *PROX1*, por meio da redução de expressão do gene *HOXD3*, possa contribuir para um fenótipo menos agressivo do carcinoma epidermóide bucal, uma vez que este gene regula a expressão de proteínas associadas com maior motilidade celular, invasão e migração, e consequentemente, metástase. Em relação ao gene *MEIS3*, sabe-se que este ligar ao DNA de genes alvos resultando na ativação ou repressão da transcrição gênica. Portanto, por promover redução na expressão de *MEIS3*, o gene *PROX1* pode estar afetando o funcionamento não somente do gene *HOXD3*, mas sim de outros genes desta família que possam estar associados com o carcinoma epidermóide bucal.

Em relação aos genes envolvidos na adesão celular que foram detectados como diferencialmente expressos entre SCC9-PROX1 e controle pela análise de microarray, as integrinas tem importante papel na adesão entre célula e matriz extracelular, tendo sido posteriormente avaliada por gRT-PCR. Integrinas constituem uma família de glicoproteínas transmembranas, heterodiméricas e cálcio dependentes, presentes em todas as células. Correspondem à maior família de receptores de adesão à matriz extracelular e atuam em diferentes vias de sinalização regulando processos celulares como proliferação, diferenciação e sobrevida celular (Hynes, 1992). Em carcinoma epidermóide bucal, ocorre redução ou perda de expressão de algumas integrinas que são encontradas no epitélio normal ou "nova" expressão de outras integrinas, associadas com a promoção do fenótipo maligno (Thomas; Speight, 2001). Dentre estas integrinas, encontra-se a integrina $\alpha 4$, a qual é expressa em baixos níveis no epitélio bucal normal. Assim, selecionamos esta integrina para validação por qRT-PCR devido à mesma se enquadrar dentro dos dois processos celulares diferencialmente regulados pelo gene PROX1: desenvolvimento vascular e adesão celular, além do fato de integrinas terem papel importante no desenvolvimento e progressão do carcinoma epidermóide bucal. Além disso, esta integrina é pouco expressa no epitélio oral, o que também foi observado nos clones SCC9-PROX1. Entretanto, não houve confirmação dos dados de expressão do microarray por qRT-PCR em relação ao gene ITGA4. Provavelmente, o gene PROX1 atua regulando outras moléculas de adesão

identificadas na análise de *microarray*, sendo que a validação de outros genes é necessária para a melhor compreensão da participação deste gene neste processo celular.

Dadras et al. (2008) realizaram a superexpressão do gene *PROX1* em linhagens celulares derivadas de angioendoteliomas e posteriormente fizeram a análise de expressão gênica por *microarray*. Interessantemente, encontraram que a superexpressão de *PROX1* também promove aumento na expressão de genes relacionados com adesão celular, embora nestas linhagens, a superexpressão de *PROX1* tenha colaborado para o ganho do fenótipo invasivo *in vivo* e maior capacidade de migração *in vitro*. Apesar de alterar a expressão de genes integrantes de um mesmo processo celular, verificamos novamente que os efeitos da superexpressão do gene *PROX1* é dependente do tecido de origem. Neste mesmo trabalho, os autores não encontraram alteração de proliferação celular nem da expressão de genes associados com este processo em decorrência da superexpressão de *PROX1*, ao contrário do que foi observado no presente estudo. A validação de outros genes é necessária para que se compreenda melhor quais genes são regulados diretamente pelo gene *PROX1*, e qual a sua relevância funcional para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal.

Invasão tecidual e metástase necessitam da remodelação e degradação da matriz extracelular. As matriz metalproteinases (MMP) pertencem ao grupo de enzimas que tem como função degradar a matriz extracelular. O equilíbrio entre a expressão destas enzimas e seus respectivos inibidores desempenha papel importante na manutenção da homeostase tecidual. A alteração na atividade das MMPs e inibidores está associada com o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

Na análise de expressão por microarray e qRT-PCR, observamos redução da expressão dos genes *MMP2* e *TIMP3* e aumento de expressão de *MMP1*. A participação destas enzimas no carcinoma epidermóide bucal já foi identificada por muitos autores (Sutinen et al., 1998; Yoshizaki et al., 2001; Gao et al., 2005). A ativação da enzima *MMP2* foi significantemente maior em amostras de carcinoma epidermóide bucal, bem como em pacientes com metástase linfonodal (Patel et al., 2005). Kawabata et al. (2008) também encontraram maior expressão de *MMP2* em tumores metastáticos e sugerem que este gene representa um importante marcador preditivo de metástase. Adicionalmente, a expressão de *MMP2* e seu respectivo

inibidor, *TIMP2*, foi relacionada não somente com metástase para linfonodos, mas também com diferenciação tumoral e pior prognóstico do carcinoma epidermóide bucal, sendo ambos fatores prognósticos importantes desta neoplasia (Yoshizaki et al., 2001; Gao et al., 2005). Assim, a redução da expressão de *MMP2* induzida por *PROX1* também pode contribuir para um comportamento tumoral menos agressivo. Por outro lado, observamos ganho de expressão de *MMP1*, enzima também associada com invasão tumoral e estágios iniciais do desenvolvimento tumoral (Cao et al., 2009). Já em relação a *TIMP3*, Sutinen et al. (1998) demonstraram expressão deste inibidor de metaloproteinase em células do estroma ao redor da neoplasia. Além disso, a superexpressão de *TIMP3* em células epiteliais de camundongos não afeta proliferação, tumorigênese, invasão celular (Sun et al., 1996).

Provavelmente, o gene *PROX1* participa da regulação de genes associados com a invasão tumoral, como observado pela expressão diferencial de genes relacionados com migração, invasão e adesão celular, incluindo os genes descritos acima. Entretanto, é importante que sejam realizados futuramente ensaios de invasão e migração celular, com o objetivo de se avaliar o papel funcional do gene *PROX1* nestes eventos associados com a progressão tumoral.

Sendo assim, o presente trabalho demonstrou de forma concreta e utilizando diferentes metodologias que a superexpressão do gene *PROX1* interfere negativamente na proliferação celular, assim como está relacionada com a expressão de citoqueratinas envolvidas com o ganho de diferenciação celular. Em nível transcricional, o gene *PROX1* participa da regulação de genes associados com a invasão tumoral, como observado pela expressão diferencial de genes relacionados com migração, motilidade e adesão celular, destacando-se a redução da expressão de *HOXD3*, *MMP2* e *TIMP3* nos clones SCC9-PROX1.

Em conjunto, esses achados *in vitro* sugerem que *PROX1* pode contribuir para a maior diferenciação e comportamento menos agressivo do carcinoma epidermóide de boca.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados, podemos concluir que:

- 1. A linhagem SCC9 apresentou superexpressão do gene PROX1.
- A superexpressão do gene *PROX1* na linhagem celular SCC9 promove significante redução da proliferação celular, contribuindo para um comportamento tumoral menos agressivo.
- 3. A superexpressão do gene *PROX1* na linhagem celular SCC9 está ssociada com o aumento de expressão das citoqueratinas 1, 13, 18 e 19. Não houve alteração na expressão das citoqueratinas 10, 14 e 16 nos clones celulares com superexpressão do gene *PROX1*. A alteração no padrão de expressão destas citoqueratinas sugere que o gene *PROX1* possa estar envolvido com a diferenciação do carcinoma epidermóide bucal.
- 4. O gene *PROX1* não interfere com a taxa de apoptose da linhagem celular SCC9.
- 5. A superexpressão do gene *PROX1* na linhagem SCC9 altera a expressão de genes associados com diferentes processos biológicos, dentre eles: desenvolvimento, adesão celular, regulação da apoptose, regulação da proliferação celular, migração, motilidade e diferenciação celular.
- 6. Houve validação dos resultados de *microarray* por qRT-PCR para os genes *MEIS3*, *HOXD3*, *MMP1*, *MMP2* e *TIMP3*. O gene *ITGA4* não foi validado por qRT-PCR. O ganho de expressão do gene *PROX1* está associado com redução da expressão dos genes *HOXD3*, *MEIS3*, *MMP2* e TIMP3, podendo colaborar para um comportamento tumoral menos agressivo.

REFERÊNCIAS¹

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

Akagami M, Kawada K, Kubo H, Kawada M, Takahashi MK, Kaganoi J, et al. Transcriptional factor PROX1 plays essential role in the antiproliferative action of interferon-gama in esophageal cancer cells. Ann Surg Oncol. 2011Mar 31[Epub ahead of print].

Alam H, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. Loss of keratin 8 and 18 leads to alterations in α 6 β 4-integrin-mediated signaling and decrease neoplastic progression in oral tumor derived cell line. J Cell Sci. 2011;124:2096-106.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. The gene Ontology Consortium. Nat Genet. 2000;25(1):25-9.

Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. Gene. 2000;247:17-31.

Bloor BK, Seddon SV, Morgan PR. Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2001;37:251-61.

Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresh DA. Induction of the angiogenic phenotype by HOXD3. J Cell Biol. 1997;139(1): 257-64.

Burke Z, Oliver G. Prox1 is an early specific marker for developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. Mech Dev. 2002;118:147-55.

Cao Z, Xiang J, Li C. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase-1 in tongue squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009;38(8):880-5. Chen X, Patel TP, Simirsii VI, Duncan MK. PCNA interacts with PROX1 and repress its transcriptional activity. Mol Vis. 2008;14:2076-86.

Dadras SS, Skrzypek A, Nguyen L, Shin JW, Schulz MMP, Arbiser J, et al. PROX-1 biomatestimatestimatestian Kapassiferm hemangiotheliomas. J Invest Dermatol. 2008;128(12):2798-806.

Daftary GS, Taylor HS. Implantation in the human: the role of HOX genes. Semin Reprod Med. 2000;18(3):311-20.

Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. Semin Cell Dev Biol. 2005;16(3):91-108.

Destro MFSS, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, et al. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation an is associated with poor prognosis. Int J Oncol. 2010;36:141-9.

Dudas J, Mansuroglu T, Moriconi F, Haller F, Wilting J, Lorf T, et al. altered regulation of PROX1-gene expression in liver tumors. BMC Cancer. 2008;132(1):9-15.

Elsir T, Berntsson SG, Orrego A, Olofsson T, Lindstrom MS, Nister M, et al. PROX1 is a predictor of survival for gliomas WHO grade II. Br J Cancer. 2011;104:1747-54.

Elsir T, Eriksson A, Orrego A, Lindstrom MS, Nistér M. Expression of PROX1 is a common feature of high-grade malignant astrocytic gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2010;69(2):129-38.

Fillies T, Jogschies M, Kleinheinz J, Brandt B, Joos U, Buerger H. Cytokeratin alteration in oral leukoplasia and oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2007;18: 639-43.

Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. BMC Cancer. 2006;6(10):1-8.

Ford HL, Kabingu EN, Bump EA, Mutter GL, Pardee AB. Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci US. 1998;95:12608-13.

Gao ZB, Duan YQ, Zhang L, Chen DW, Ding PT. Expression of matrix metalloproteinase 2 and its tissue inhibitor in oral squamous cell carcinoma. Int J Mol Med. 2005;16(4):599-603.

Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. Annu Rev Genet. 1986;20:147-73.

Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. J Cell Biol. 2001;154:763-773.

Grier D, Thompsom A, Kwasniewska A, McGonigle G, Halliday H, Lappin T. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. J Pathol. 2005;205:154-71.

Hamada J, Omatsu T, Okada F, Furuuchi K, Okubo Y, Takahashi Y, et al. Overexpression of homeobox gene HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. Int J Cancer. 2001;93:516-25.

Hassan B, Li L, Bremer KA, Chang W, Pinsonneault J, Vaessin H. Prospero is a panneural transcription factor that modulates homeodomain protein activity. Proc Natl Acad Sci. 1997;94:10991-6.

Hassan NMM, 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;16:217-24.

Hazan RB, Plillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. J Cell Biol. 2000;148:779-90.

Hong YK, Detmar M. PROX1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. Cell Tissue Res. 2003;314:85-92.

Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, et al. PROX1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. Dev Dyn. 2002;225:351-7.

Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, et al. Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. Cancer Sci. 2003;94(5):437-41.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. Cell. 1992;69:11-25.

Kawabata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, et al. Active-MMP2 in câncer cell nests of oral câncer patients: correlation with lymph node metastasis. Int J Oncol. 2008;13(4):699-704.

Klingbeil MF, Herson MR, Cristo EB, dos Santos PD, Jr., Yoshito D, Mathor MB. Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. Cell Tissue Bank. 2009;10(3):197-204.

Laerm A, Helmbold P, Goldberg M, Dammann R, Holzhausen HJ, ballhausen WG. prospero-related homeobox 1 (PROX1) is frequently inactivated by genomic deletions and epigenetics silencing in carcinomas of the lilary system. J Hepathol. 2007;46:89-97.

Lavado A, Oliver G. Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. Dev Dyn. 2007;236:518-24.

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

Li L; Vassin H. Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during Drosophila neuropgenesis. Genes Dev. 2000;14:147-151.

Manak JR, Scott MP. A class act: conservation of homeodomain protein functions. Dev Suppl. 1994; 61-7.

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;15(88):6348-52.

McGinnis W, Krumlauff R. Homeobox genes and axial patterning. Cell. 1992;68:283–302.

Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. Anticancer Res. 2003;23(3):2101-10.

Matizonkas ALF, libório TN, Aquino Xavier FC, Silva MGV, Michaluarte-Junior P, Nunes FD. Detection of TGIF1 homeobox gene in oral squamous cell carcinoma according to histologic grading. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111(2):218-24.

Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, et al. Emergence of keratin 17 vs loss of keratin 13: Their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. Oral Oncol. 2011;47:497-503.

Miyazaki YJ, Hamada J, Tada M, Feruuchi K, Takahashi Y, et al. HOXD3 enhances motility and invasiveness through the TGF- β -dependent and –independent pathways in A549 cells. Oncogene. 2002;21:798-808.

Moens CB, Selleri L. HOX cofactors in vertebrate development. Dev Biol. 2006;291:193-206.

Morifuji M, Taniguchi S, Sakai H, Nakabeppu Y, Ohishi M. Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability. Am J Pathol. 2000;156(4):1317-25.

Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. J cell Biol. 2000;148(2):343-51.

Nagai H, Li Y, Hatano S, Toshihito O, Yuge M, Ito E, et al. Mutations and Aberrant DNA methylation of the PROX1 gene in hematologic malinancies. Genes Chromossomes Cancer. 2003;38:13-21.

Okubo Y, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Tsutsumida A, Furuuchi K et al. Transduction of HOXD3-antisense into human melanoma cells results in decreased invasive and motile activities. Clin Exper Metastasis. 2002;19:503-11.

Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ, Gruss P. Prox1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. Mech Dev. 1993;44:3-16.

Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. J Surg Oncol. 2005;90(2):81-8.

Pattin A, Goridis C, Brunet JF. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. Mol Cell Neurosci. 2000;15:235-43.

Petrova TV, Nykanen A, Normen C, Ivanov KI, Andersson LC, Haglunj C, et al. Trascriptional factor PROX1 induces cancer colon progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. Cancer Cell. 2008;13:407-19.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.

Presland RB, Jurevic RJ. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. J Dent Educ. 2002;66(4):564-74.

Raul U, Sawant S, Dange P, Kalraya R, Ingle A, Vaidya M. Implications of cytokeratin 8/18 filaments formation in stratified epithelia cells: induction of transformed phenotype. Int J Cancer. 2004;20:662-8.

Reis RM, Reis-Filho JS, Lopes Filho A, Tomarev S, Silva P, Lopes JM. Differential PROX-1 and CD31 expression in mucousae, cutaneous and soft tissue vascular lesions and tumors. Pathol Res Pract. 2005;201:771-6.

Risebro CA, Searles RG, Melville AAD, Ehler E, Jina N, Shah S, et al. PROX1 maintains muscle structures and growth in developing heart. Development. 2009; 136(3):495-505.

Rodini CO. Expressão de transcritos de genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca: análise por mycroarray, validação por qRT-PCR e relação com critérios clínicos de agressividade [tese]. São Paulo: Universidade de são Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: Insights from developmental regulation and derulation. Eur J Cancer. 2005;41:2428-37.

Schaefer JJ, Oliver G, Henry JJ. Conservation of genes expression during embryonic lens formation and cornea-lens transdifferentiation in Xenopus laevis. Dev Dyn. 1999;215:308-18.

Schneider M, Buchler P, Giese N, Giese T, Wilting J, Buchler M et al. Role of lymphangiogenesis and lymphangiogenic factors during pancreatic cancer progression and lymphatic spread. Int J Oncol. 2005;28:883-90.

Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, Kono T, Ikai I, Kubo H. A homeobox protein, PROX1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 2006;12(20):6005-11.

Silveira EJD, Godoy GP, Lins RDAU, Arruda ML, Ramos CCF, Freitas RA, et al. Correlation of clinical, histological and cytokeratin profile of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. Int J Surg Pathol. 2007;15(4):376-83.

Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires PROX1. Nat Genet. 2000;25:254-5.

Srebrow A, Friedmann Y, Ravanpany A, Daniel CW, Bissel MJ. Expression of Hox A1 and Hox B7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells. J Cell Biochem. 1998;69:377-91.

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

Sun Y, Kim H, Parker M, Stetler-Stevenson WG, Colbum NH. Lack of suppression of tumor cell phenotype by overexpression of TIMP-3 in mouse JB6 tumor cells: identification of a transfectant with increased tumorigenicity and invasiveness. Anticancer Res. 1996;16:1-7.

Sutinen M, Kainulainenl T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP.1 and -2) and their inhibitors (TIMP.1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis Br J Cancer. 1998;77(12):2239-45.

Takahashi M, Yoshimoto T, Shimoda M, Kono T, Koizumi M, Yazumi S, et al. Loss of function of the candidate tumor suppressor gene PROX1 by RNA mutation in human cancer cells. Neoplasia. 2006;8(12);1003-10.

Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. Crit Rev Oral Biol Med. 2001;12(6):479-98.

Tomarev SI, Sundin O, Banerjee-Basu S, Duncan MK, Yang JM, Piatigorsky J. Characterization of the mouse PROX1 gene. Biochem Biophys Res Commun. 1998;248:684-9.

Toyoshima T, Vairaktaris E, Nikenke E, Schlegel KA, Neukam FW, Ries J. Hematogenous Cytokeratin 20 mRNA detection has prognostic value in oral squamous cell carcinoma: preliminary results. Anticancer Res. 2009;29:291-8.

Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. Biochimie. 2005;83:287-97.

Van der Veldeb LA, Manni JJ, Ramaekers FC, Kuijpers W. Expression of intermediate filament proteins in benign lesios of the oral mouth. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1999;256(10):514-9.

Versmold B, Felsberg J, Mikeska T, Ehrentraut D, Kohler J, Hampl JA, et al. Epigenetic silencing of the candidate suppressor gene PROX1 in sporadic breast cancer. Int J Cancer. 2007;121:547-54.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, Triveti TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. J Surg Oncol. 2003;82(1):34-50.

Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. PROX1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. Nat Genet. 1999;21:318-22.

Wigle JT, Oliver G. PROX1 functions is required for the development of the murine lymphatic system. Cell. 1999;98:769-78.

Yamatoji M, Kasamatsu A, Yamano Y, Sakuma K, Ogoshi K, Ivoda M, et al. State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2010;23(1):61-7.

Yoshimoto T, Takahashi M, Nagayama S, Watanabe G, Shimada Y, Sakasi Y, et al. RNA mutations of prox1 detected in human esophageal cancer cells by the shifted termination assay. Biochem Biophys Res Comm. 2007,359(2):258-62.

Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2

and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2001;95(1):44-50.

Zhong L, Chen W, Zhang C, Zhang Z. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104:377-84.

Zhong LP, Zhao SF, Chen GF, Ping FY, Xu ZF, Hu JA. Increased levels of CK19 mRNA in oral squamous cell carcinoma tissues detected by relative quantification with real-time polymerase chain reaction. Arch Oral Biol. 2006,51:1112-9.

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

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO FR - 206520 Protocolo 149/2008

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa: "Perfil da expressão gênica por microarraanjo, de células de carcinomas epidermóides de boca superexpressando o gene HOXD11", de responsabilidade da Pesquisadora Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro e sob orientação do Prof(a). Dr(a). 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, 11 de agosto de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". São Paulo - SP - CEP 05508-900 –Telef./FAX (0XX11) 3091-7887

-				
Genes hiperexpressos nos clones SCC9-PROX1 (<i>fold-change</i> ≥2)				
FLJ39005	AQP9	CALML5	CNN1	DCAMKL2
AAMP	ARC	CAP2	CNN3	DCBLD1
AARSD1	ARHGAP2	CAPN5	CNP	DCDC1
ABCC3	ARHGDIB	CASP8	COIL	DCN
ABCG2	ARHGEF10	CAV2	COL12A1	DDAH2
ABCG5	ARHGEF15	CBS	COL13A1	DDEF1
ABL2	ARL4A	CBX3	COL1A1	DDX3Y
ACAT2	ARRB1	CBX5	COL1A2	DDX53
ACMSD	ARRDC3	CCDC104	COL3A1	DDX56
ACOX2	ARSF	CCDC19	COL5A1	
ACSL1	ASB16	CCDC8	COL6A1	DEFB103A
ACTN1	ASCC3	CCL18	COL6A2	DENND2A
ACTN3	ASPH	CCL5	COL8A1	DES
AD7C-NTP	ASTE1	CCNC	CPA4	DHRS10
ADAM23	ATF1	CCND3	CPVL	DIAPH3
A AMTS1	ATF7	CCRK	CPZ	DISP2
ADAMTS17	ATOX1	CD22	CRIP1	DLC1
ADCY2	ATP6V1C2	CD24	CRP	DLEU1
ADFP	AUTS2	CDC6	CRTAC1	DLEU2
ADIPOQ	AXL	CDH16	CRYGC	DMBT1
ADM	AYP1	CDH18	CSF3	DMBX1
ADRA2C	B3GALT4	CDH2	CSNK1G1	DNAH11
AFG3L1	BAG2	CEACAM20	CSRP1	DNAI2
AK3L2	BAIAP2L2	CEP152	CST6	DNAJC17
AKAP12	BAMBI	CEP250	CTAG2	DOCK8
ALDOC	BCAS1	CETN2	CTGF	DPF1
ALMS1	BCAS4	CFL2	CTH	DPY19L2
ALPK2	BEX1	CFLAR	CTSW	DRD1
ANAPC13	BMP2K	CHAC2	CUL4B	DSC2
ANGPTL2	BNIP3	CHES1	CX3CR1	DSCR1L1
ANGPTL4	BPIL3	CHFR	CXCL2	DSPG3
ANKAR	BRI3BP	CHI3L2	CYB5D1	DUSP4
ANKRD39	BRP44L	CHIC2	CYB5R4	DUX2
ANKRD53	BRUNOL6	CHN1	CYP2B6	DUX4
ANP32A	BTBD14A	CHRAC1	CYP4B1	DYNC2LI1
AOC3	GAGE7	CHST2	CYP4X1	ECE1
AOF2	GALC	CIAS1	CYR61	EDG1

ANEXO B – Genes diferencialmente expressos na análise de expressão por microarray.

Genes hiperexpressos nos clones SCC9-PROX1 (fold-change >2)				
AOX1	BTN2A1	CITED2	D4S234E	EEF1E1
AP1B1	BTNL2	CLDN17	D70835	EFCBP1
AP1S2	BUB1B	CLGN	D89937	EFHD1
AP4S1	BYSI		DAB2	FFS
APC2	C1GALT1	CLIC3	DAPK1	EIF2AK2
APCDD1L	C1QC	CLSPN	DAPK2	ELF4
APOBEC3A	C1QL1	CMYA1	HIST1H4B	INHBA
ELL2	C6	GCNT1	HIST1H4D	INHBB
ENO1B	CA9	GDF3	HIST1H4L	INSIG1
ENO2	FLJ21438	GFRA4	HIST3H2BB	IQCD
ENPP1	FLJ22374	GH2	HLX1	IREB2
EP400NL	FLJ22555	GJA5	HMG4L	ITGBL1
EPB41L2	FLJ22596	GLIPR1	HMGA2	JMJD5
EPPK1	FLJ22639	GLRX	HMGCR	JPH2
EPR1	FLJ22763	GLTSCR1	HMGCS1	JUND
ERCC6	FLJ25328	GNA14	HMGN3	KCNA10
ERVK6	FLJ32252	GNAI3	HOP	KCNH3
ETV4	FLJ39660	GNAZ	HOXB1	KCNJ2
E 5	FLJ42709	GNB4	HOXC4	KCNN1
FA M3	FLJ43080	GNG13	HOXC5	KIAA0152
FAM101B	FLNB	GOLGA2	HOXC6	KIAA0286
FAM111A	FLRT3	GPATC3	HPCA	KIAA0350
FAM112B	FMR1NB	GPR146	HPCAL1	KIAA0701
FAM122B	FN1	GPRC5A	HPX-2	KIAA1458
FAM27L	FOLR3	GPRC5B	HRASLS	KIAA1751
FAM41C	FOSL2	GPRC5D	HRASLS2	KIAA1913
FAM46A	FOXB1	GRB10	HRASLS3	KIAA1922
FAM54A	FOXP3	GSCL	HRASLS5	KIAA2010
FAM71C	FPR1	GTF2F1	HSAJ2425	KIF13A
FANK1	FRMD5	GUCY1B3	HSD11B1	KIF9
FAP	FRMD6	GZMB	HTRA1	KIFC1
FBLN2	FSTL1	H12329	HYI	KIR3DL2
FBN1	FTHL12	H19	IBRDC1	KLF7
FBXL18	FTMT	H43551	ID4	KLHL13
FBXO5	FZD10	HBS1L	IER3	KLK5
FGD2	G36726	HCG4	IFNA14	KLK6
FGF11	GAB3	HDAC6	IGF2	KRT34
FGFR10P	GABRD	HDDC2	IGFBP1	KRT8
FGFR4	GAD1	HEBP2	IGFBP3	KRTAP1-5
FKHL18	GADD45A	HEG1	IGHG1	KRTAP11-1
FLJ11151	GAGE7	HEY1	IGHV1-69	L1CAM
FLJ11506	GALC	HGFAC	IL17B	L2HGDH

Genes hiperexpressos nos clones SCC9-PROX1 (<i>fold-change</i> ≥2)				
LHX5	S81524	GAS1	NEXN	PCDHB8
LMCD1	SAFB	GATA1	HIPK2	NP511407
LMO2	SARDH	GATA3	HIST1H1B	RKHD3
LONRF3	SCG5	GBE1	HIST1H1C	RNF130
LOXL1	SEMA7A	GBX2	HIST1H1E	RNF182
LPAAT-THETA	SERPINA12	GCAT	HIST1H2BK	RNF186
LRCH2	SERPINB2	GCGR	LGALS9	ROBO1
LRRC16	SERPINB9	LGICZ1	NPAS3	ROPN1L
LRRC55	SERPINE2	MMP24		ROR1
LRRC6	SERPING1	MMP3	NPNI	RORA
LTV1	SERPINI2	MOP-1	NPR3	RPP21
LUM	SFRP1	MORF4L2	NPIXR	RPP40
LUZP2	SFRS6	MRPL14	NR2F1	RPS27L
M31157	SGCB	MRPL18	NRBP1	RPS4Y1
MAFB	SGK	MRPL51	NRL	RPS4Y2
MAGEA4	SH3BP4	MRPS28	NRP1	RRAD
MAGI1	SPTA1	MRS2L	NRSN2	RSHL2
MAL	SRF	MSX2	NT5E	RSPO3
MAP2K4	TGM2	MT1L	NTS	RTKN
MAP6D1	ZNF676	MT1M	OBP2A	RTN4
MARCO	WISP2	MTCH2	OCLM	RUNX2
MASA	WISP3	MTIF2	OIP5	RWDD1
MBL1P1	WNT11	MUC15	OLFML3	S100A1
MBOAT1	WNT5B	MUCDHL	OLIG3	S100A3
MC3R	X62691	MUT	OR1S2	S51112
MCCC2	X77690	MXRA5	OR5I1	S69873
MCFD2	X86121	MYH13	OR8K3	S80931
ME1	XAGE1	MYO1E	OSAP	IL6
MEA1	XAGE2	MYPN	OSBP2	IL9
MFAP4	XG	N28017	OSCAR	IMMP1L
MFRP	XRCC6BP1	N47494	OSTM1	INDO
MFSD1	Z20144	N48043	OTP	INDOL1
MGAT3	Z21831	N67009	OVOL1	INE1
MGAT5B	Z21967	N75321	OXSR1	PDK1
MGC11102	Z28739	N75427	P4HA1	PDLIM3
GC16121	ZBTB2	NAALADL1	PADI1	PDZK1
MGC23985	ZBTB24	NACAL	PAGE2	PEG10
MGC26647	ZBTB7B	NAV3	PAGE5	PEG3
MGC32805	ZCCHC12	NCAM1	PALM2-AKAP2	PF4V1
MGC35308	ZFAND2A	NCLN	PBX1	PFKFB3
MGC87631	ZFHX1B	NEK11	PCDH9	PGAM1
MIG7	ZFY	NEO1	PCDHA1	PGBD1
	ZNF155		PCDHB2	PGBD3

Gene	s hiperexpressos	nos clones SCC	9-PROX1 (fold-ch	ange ≥2)
PGM3	PRDM1	TTTY5	RGS2	WDR16
PHACTR1	PRDM13	TBX2	RGS4	WDR19
PHF10	PRKAG2	TBX3	RHO	WDR5
PIGA	PRKAR2B	NFATC2	RHOBTB2	ZNF681
PIK3C2A	PRLH	NHLH2	RIG	ZNF713
PITPNC1	PRLHR	NKD2	RIPK3	ZNF76
PKIB	THBS1	NKX6-2	TWIST1	ZNF91
PLAC8	TIAM2	NLF2	U01925	ZNF93
PLAUR	TLR6	NMUR2	U04815	ZP1
PLB1	TMEFF2	NOL7	U05589	ZP2
PLD5	TMEM111	NP111687	U12206	ZNF528
PLEKHC1	TMEM132D	SIGLEC12	U22680	ZNF565
PLEKHN1	TMEM139	SIPA1L2	U2AF1L4	ZNF583
PLEKHQ1	TMEM14B	SLC12A8	U2AF2	TCF19
ZNF2	TMEM16D	SLC17A1	U82320	TCF23
ZNF206	TMEM2	SLC20A1	U85992	TCN1
ZNF257	TMEM27	SLC25A21	U88316	TUBB2A
ZNF292	TMEM53	SLC2A14	U94902	TUBB2B
ZNF326	TMEM55B	SLC2A3	U94903	TUBB2C
ZNF333	TMEM63A	SLC30A1	UBD	WDR76
ZNF334	TMSB4X	SLC38A2	UBE2C	WFS1
ZNF350	TncRNA	SLC44A4	UBE2J1	WISP1
ZNF408	TNFAIP6	SLC6A1	UBIAD1	TCEB3C
ZNF428	TNFRSF9	SLC7A2	UCN3	
ZNF43	TNFSF7	SLC7A8	UHRF1	7NF517
ZNF433	TNIP1	SLCO2A1	UNKL	SRR
ZNF471	TNNC2	SLIC1	UNQ6488	SSR1
SPANXD	TNR	SLIT2	USP11	SST
SPARC	TNRC5	SLITRK6	USP16	ST3GAL1
SPATA19	TPM4	SMOX	USP45	ST70T1
SPATA4	TPMT	SMPD2	USP49	ST8SIA2
PCMT1	TRAM2	SMPX	UTP20	STAC
PCSK	TRBV5-4	SMTN	UTRN	STC2
PCSK9	TREM1	SNAP29	VGCNL1	STOX1
PCTK1	TRIB2	SNORD22	VGLL1	STRN3
PCYT2	TRIM39	SNX26	VIL2	STX2
PDCD1LG2	TRIM43	SNX8	VIM	STXBP5
T05215	TRPM2	SOX4	W05707	SUGT1
T07777	TSPAN4	SP100	W27166	SUPT3H
T11922	TSPY1	SPAG9	W45382	SVOP
T12588	TSPY2	SPAM1	W81715	SYN1
T19827	TTC16	SPANXA1	W95609	SYNCRIP
T25391	ТТК	SPANXB2	WBP5	UTNOI
0	Genes hiperexpresso	s nos clones SCC	9-PROX1 (fold-cha	ange ≥2)
---------	---------------------	------------------	-------------------	----------
T35358	TTTY9A	POLR1C	RARRES1	LAMA4
T40959	TTYH2	POPDC3	RASD1	LANCL2
T82292	SPCS3	POU5F1	RASGEF1C	LANCL3
TAAR1	SPI1	PPAP2B	RBM35B	LCE3C
TACC3	SPINK6	PPARG	RBMS3	LCN12
TACR1	SPPL2B	PPFIA3	RBMY1E	LGALS7
TAGLN	SPRR4	PPFIA4	RBP4	PRMT5
TAS1R1	ZNF654	PPIF	RDBP	PRO1073
TAS2R48	ZNF668	PPP5C	RER1	PROX1
TASP1	ZNF675	PRAM1	RETN	PRSS3
TBC1D7	ZNF680	PRAMEF3	REXO1L1	PSCD2L
TBN	ZNF681	PLOD2	RFP	PSCD3
PTGER2	PTX3	PNMT	RFPL3	PSG3
PTGS2	PUS7L	PNPLA2	RGAG4	PSG4
PTHLH	PXDNL	RAET1K	R3HDM2	PSMC3IP
PTPRR	QRSL1	RAGE	RAB30	RABL5

Genes	hipoexpressos n	os clones SCC9	-PROX1 (fold-cha	nge ≤2)
CCDC67	ARMETL1	BC039397	CAMKK1	COP1
AADACL2	ARNTL2	BC039457	CAMP	COX7B2
ABCA4	ARRDC4	BC041417	CARD12	CPD
ABCC5	ARSK	BC041686	CARD15	CPEB3
ABCG1	ARTS-1	BC042172	CASP1	CPT1C
ABCG4	ASGR1	BC042589	CBLC	CREG1
ABHD6	ASNS	BC043283	CBX7	CRIP2
ABLIM1	ASPHD2	BC043357	CCBL1	CRYL1
ABLIM2	AT_L_3	BC043411	CCDC114	CSH1
ACCN2	AT_L_M	BC046476	CCDC36	CSMD1
ACSS1	ATF7IP2	BC047110	CCDC37	CSRP3
ADA	ATP2B4	BC048201	CCDC76	CTSC
ADAMTS12	ATP6V0A4	BC063641	CCR8	CTSH
ADAMTS4	ATP6V1E2	BC071797	CCR9	CXADR
ADCY6	ATP7B	BC082970	CD3G	CXCL11
ADCY7	AY358239	BCAN	CD72	CXXC4
ADCY9	AY358259	BCDO2	CD74	CYB5D2
ADRA1A	B4GALNT4	BCHE	CDH20	CYP26B1
ADRB2	B4GALT5	BCL11A	CELSR1	CYP2J2
ADSSL1	BACE1	BCL2L14	CELSR2	CYP2S1
AGPAT4	BAHCC1	BCORL1	CENPK	CYYR1
AGRIN	BATF2	BDKRB1	CEP68	DAB2IP
AIFL	BC009735	BDKRB2	CFB	COL7A COMP
ALDH1A3	BC015334	BIC	CFTR	IL22RA1
ALDH1L2	BC015434	BIK	CH25H	IL27RA
ALDH A1	BC015903	BIRC3	CHD5	IL28RA
ALDH3A2	BC016022	BIVM	CHID1	IL2RB
ALOX5	BC016673	BMP8B	CIITA	IL7
ALS2CR13	BC017848	BRSK1	CKMT1B	INSL5
ALS2CR7	BC018597	BST2	CLC	IRF5
AMDD	BC021296	BTG2	CLDN1	ISG20
ANK3	BC029255	C1QTNF6	CLDN14	ITGA1
ANKR 20A2	BC031882	C1RL	CLYBL	ITGA4
ANKRD29	BC031973	C1S	CMIP	ITGAV
ANKRD34	BC032907	C5	CMTM8	ITGB2
AOF1	BC033940	C8G	COCH	ITGB8
APOBEC3G	BC035156	CA11	COL2A1	JAG2
APOL3	BC035417	CA12	COL4A6	JAK3
AQP3	BC036599	CA2	KCNH8	K03200
ARHGAP22	BC036626	CACNB4		KA21

Ger	nes hipoexpressos nos clones SCC9-PROX1 (fold-chanαe ≤2)			
FLJ32063	GABRE	NINJ1	ARMCX2	FLJ31356
FLJ32784	GALM	NKRF	EFHC2	FLJ31951
FLJ35220	GALP	NMNAT3	ELF3	GPSM1
FLJ37078	GAMT	NOD9	ELL3	GRAMD1C
FLJ38359	GBP4	NOTCH1	ELMOD1	GRID1
FLJ40142	GC	NP1165618	EMX2	GRK5
FLJ41603	GCNT3	NP239955	ENAM	GSTM3
FLJ41747	GDF15	NPL	EPB49	GTA
FLJ90680	GFPT2	NRTN	EPHX1	GYLTL1B
FMN2	GIMAP2	NUDT12	EREG	HAS3
FOLH1	GLI1	NUDT13	ERO1LB	HBE1
FOS	GLUL	NUFIP2	ESPN	HBG1
FOXK1	GLULD1	NUP210L	ESRRA	HCP1
FOXL2	GNAI1	NUP62CL	ESX1	HERV-FRD
FRAS1	GPR109B	OAF	EVA1	HEYL
FSD1	GPR116	OBSL1	F2R	HHEX
FUK	GPR155	OLFML2A	FABP7	HISPPD2A
FUT1	GPR22	OLR1	FADS3	HIST1H4F
FXYD3	GPR30	OR10R2	FAM19A3	HIST1H4I
FYCO1	GPR56	OR13D1	FAM59A	HIST2H4A
G0S2	GPR98	OSBPL5	FAM70A	HLA-DMA
GAA	GPRASP1	OSGEPL1	FAM78A	HLA-DMB
DNAJB9	KLK11	KIAA1505	FAM81B	HLA-DPA1
DNAJC12	KLRC1	KIAA1571	FAS	HLA-DPB1
DNALI1	KLRC2	KIAA1622	FAT2	HLA-DRA
DNASE2B	KLRC3	KIAA1712	FBXO46	HOMER2
DNM3	KLRC4	KIAA1826	FBXW10	HOOK1
DSC1	KREMEN2	KIF1B	FCGR3A	KCNJ15
DTX2	KRTCAP3	KLHDC8B	FCGRT	KCNJ16
DUOX2	L1TD1	KLHL24	FCHO1	KCNK5
EDAR	LAMA5	KLK1	FCMD	KCNN4
EDG8	LAMC1	RIT2	FDXR	KCNQ1
DAZL	LAMP3	RLBP1	FEZ1	KCNV1
DDC	LARP6	RMND5B	FGF13	KHK
DDX26B	LCN2	LILRA3	FGFR2	KIAA0182
DET1	LEAP-2	LINCR	FGFR3	KIAA0513
DHRS3	LEF1	LMO1	FLI1	KIAA0649
DLG3	LEMD1	LOXL4	FLJ14167	KIAA0703
DLL1	LEPREL2	MAPKBP1	FLJ20035	KIAA1107
DLX4	LGALS2	MARK1	FLJ20097	KIAA1147
DNAJA4	LGP1	MASK-BP3	FLJ23447	KIAA1166
SORCS2	LGP2	MATN2	FLJ30046	KIAA1217
	LHX9	MBNL2	FLJ31196	KIAA1305

Gen	es hipoexpressos	s nos clones SCC	9-PROX1 (fold-cha	ange ≤2)
MCOLN2	TRPV4	HOXA11S	PSAT1	SCARA3
MEP1B	TSLP	HOXB9	PSCA	SDR-O
MGC11271	TSPAN1	HOXD1	PSCDBP	SEMA4G
MGC16075	TST	HRH2	PSD2	SERPINA1
MGC18216	TIMP3	HSD17B6	PSD3	SERPINA3
MGC3207	TINAGL1	HSD3B7	PSMAL	SERPINB3
MGC3265	TLR2	HSPA12A	PTAFR	SERPINB4
MGC43122	TLR5	HSPA6	PTGS1	SEZ6L2
MGC50559	TMC4	HSPC105	PTN	SH3KBP1
MGC52110	TMC5	HTN3	PTPRZ1	SH3PXD2A
MGST2	TMC7	HTR1D	PUS3	SH3YL1
MID1IP1	TMEM102	HTR7	PVRL1	SHPRH
MINPP1	TMEM118	IBRDC3	PYCARD	SIRT4
MMP11	TMEM119	ICAM2	QPCTL	SLC12A5
MMP2	TMEM132A	IHPK3	RAB33B	SLC13A1
MMP28	TMEM16C	IL15RA	RAB3D	SLC13A3
MPP7	TMEM16J	IL18R1	RAB7B	SLC1A3
MPST	TMEM44	IL1A	RAC2	SLC1A4
MT1	TMEM55A	IL1B	RAG1	SLC22A3
LPHN1	TMEM61	OSR1	RAI17	SLC25A18
LRIG3	TMEM69	OVOS2	RAMP1	SLC25A5
MTL5	TMEM92	OXCT2	RAPGEFL1	SLC27A2
MTSS1	TMIE	P2RY5	RASA4	SLC2A11
MUC20	TMOD2	P2RY6	RASSF4	SLC2A6
MX2	ZNF512	PAH	RASSF5	SLC2A9
MYB	ZNF516	PAOX	RNF128	SLC37A1
MYEF2	ZNF519	PAPOLB	RNF133	SLC45A4
MYO15A	ZNF525	PAPOLG	RNF44	TMPRSS4
MYOC	ZNF557	PARD6B	RYR1	TNAP
N50366	ZNF589	PARG	S100A7	TNC
NALP1	ZNF750	PARK2	S100A9	TNFAIP2
NALP7	ZPBP	PARP16	S100B	TNFRSF10
NCF1	ZSWIM3	PARP8	S73202	B
NC AP1L	ZNF488	PCDH17	SAA1	TNFRSF14
NDN	ZNF510	PCDHB6	SAA2	TNFSF10
NDRG2	RIPK4	PCTP	SAA4	TNFSF12
NEFL	THSD1	PDE4A	SALL2	TNNI2
NFATC1	PDIA2	PDE6H	SAMSN1	
NFIA	PDLIM1	PDGFD	SATB1	TNNT3
NGFR	LRP1	LRRC3	LSP1	TOR1B
NICN1	LRP4	LRRC56	LTB	TP53AP1
STAT4	LRRC20	LRRC8C	LTBP4	TP73L
SMYD4	SOX2	STARD5	SORL1	TPH1

	<u> </u>			
	Senes hipoexpres	ssos nos clones SC	C9-PROX1 (fold-cha	ange ≤2)
RASSF6	STAT5A	LRRC3	SPIN3	RHCG
RAVER2	STEAP2	LRRC56	SPRR1B	RICTOR
RBM11	STOM	LRRC8C	SPRR3	RIMS3
RBP7	STXBP6	LY6D	SPZ1	RIN1
RCBTB2	SULT1A4	LY75	SQRDL	SNCA
RCSD1	SULT2A1	LYSMD2	SR140	SNCG
RDH12	SYCP3	M27126	SRGAP3	SORBS2
RDM1	SYNPO2	MAGEA10	SSH3	
REEP2	SYT17	MAMDC2	SSX1	
RET	TAS2R38	MANSC1	SSX4	
RETSAT	TBC1D8B	MAP2K6	SSX6	
RFPL2	TBC1D9	SLC4A9	ST6GALNAC1	
RFXAP	TBL1Y	SLFNL1	ST6GALNAC2	
RHBDF2	TFCP2L1	SMO	ST6GALNAC5	
THBD	TGM5	SMOC2	STARD5	