THAÍS ACQUAFREDA ANTUNES

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES HOMEBOX EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA
ESTIMULADAS PELO ÁCIDO RETINÓICO**

São Paulo

2009

Thaís Acquafreda Antunes

Perfil da expressão de genes homeobox em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca estimuladas pelo ácido retinóico

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2009

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

Antunes, Thaís Acquafreda
Perfil da expressão de genes homeobox em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca estimuladas pelo ácido epidermóide / Thaís Acquafreda Antunes; orientador Fabio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2009.

111p. : fig., tab.; 30 cm.

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

1. Genes homeobox – Carcinoma de células escamosas – Avaliação 2. Patologia bucal

CDD 617.63

BLACK D61

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

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Antunes TA. Perfil da expressão de genes homeobox em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca estimuladas pelo ácido retinóico [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ___/___/ 2009.

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus co-orientadores **Prof. Dr. Kenneth J. Soprano** e **Prof^a. Dra. Dianne R. Soprano** por me receberem em seus laboratórios, me ensinarem tanto sobre pesquisa e colaborarem de forma fundamental na execução desse trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Vera Cavalcanti de Araújo** e ao **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo** pelo exemplo em pesquisa em Patologia Bucal no Brasil.

À todos os professores da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, **Prof^a. Dr^a. Suzana C. Orsini Machado de Sousa**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, **Prof^a. Dr^a. Marina Helena C. G. de Magalhães**, **Prof^a. Dr^a. Andréa Mantesso** e **Prof^a. Dr^a. Karem Lopes Ortega** pelo convívio, disponibilidade e ensino em Patologia Bucal.

À **Prof^a. Dra Marília Trierveiler Martins** que, além de me ensinar muito sobre pesquisa e Patologia Bucal, foi uma grande amiga durante esses anos de Pós-Graduação.

Às amigas e companheiras de laboratório **Dorret Gardner**, **Evelyn Sirisani**, **Erin Payne**, **Dr^a. Maria Radu** e **Dr^a. Jianhua Zhao (JJ)** que me receberam de braços

abertos no laboratório, me ajudaram, me incentivaram, me mostraram um pouquinho da cultura de vocês e fizeram com que o trabalho fosse sempre mais alegre e divertido.

Aos colegas de laboratório **Brandy Pickens, Bryan Teets, Fang Wang e Zhen Ping Zhang** pela convivência e sugestões dadas nesse trabalho.

Aos amigos da Turma da Copa da Patologia Bucal:

Paulo. Agradecer você é algo muito difícil. Não sei nem por onde começar. Seria pela companhia desde a Graduação, inclusive no ônibus? Seriam pelas piadas ótimas que você solta? Seria pelo exemplo de profissional? Seria pelo amigo legal que você é? A única coisa que sei, é que você fez esses anos de Odontologia/Patologia serem muito mais divertidos.

Karen. Agora **Prof^a. Dr^a. Karen Renata Nakamura Hiraki.** Pelo exemplo de pessoa que você. Uma amiga extraordinária, companheira e dedicada e uma profissional exemplar. Você faz muita falta por aqui.

Juliana. Pela amizade e companheirismo durante esses anos. E que, mesmo quando eu estava fora, sempre fez questão de manter contato. Estou torcendo muito pelo seu sucesso.

Alexandra. Pelo exemplo de pessoa que consegue se desdobrar entre pesquisa e consultório, mas ainda arruma tempo para ser uma grande amiga e ter sempre na ponta da língua uma música da nossa infância, que ninguém mais lembrava que existia.

Renata. Pela amizade, companheirismo, troca de idéias e exemplo de profissional e pessoa que você é.

Nathalie. Pela amizade durante todos esses anos de pós. Em especial, durante o doutorado quando as nossas vidas passaram por grandes mudanças, mas que conseguimos superar tudo com muito luxo, glamour e sofisticação.

Fabi e Márcio. Pelo exemplo de pessoas que vocês são. Profissionais competentes, que conquistaram o espaço e respeito no departamento. Amigos leais, fiéis, companheiros e que, além de tudo, formam um casal lindo. Também tenho que agradecer por permitirem que o apartamento de vocês seja o quartel-general da turma.

Pati Adachi. Pela convivência, amizade e apoio durante esses anos.

Aos amigos **Erin, Jess, Tim, Kate, Becka, Virginia, Monica, Panos, Bryan, Danielle, Lis, Phil, Todd e Ryan** que me receberam muito bem e me mostraram como é a vida americana fora do laboratório e nos horários de happy hour. Sem a amizade de vocês os meus dias na Philadelphia teriam sido muito mais difíceis.

À **Prof^a. Dr^a. Tatiana Libório** pelo apoio, troca de experiências, convivência e, acima de tudo, amizade, durante todos esses anos.

À **Dra. Márcia Campos** pelo apoio e amizade, mesmo que a distância e um pouco tardia.

Aos colegas da Patologia Bucal **Aline, Aluna, Ana Cláudia, Arthur, Brunno, Camila Fragata, Camila Rodini, Erika, Fábio Coracin, Fátima, Felipe Sperandio, Fernanda Yamamoto, Fernanda Giudice, Flávia Caló, Kati, Luciana Sassa, Marina, Roberto, Yonara** pelo apoio e convivência.

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

Ao **Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa para cursar a Pós-Graduação em Patologia Bucal e pela bolsa PDEE para estágio no exterior.

Ao **National Institute of Health** pelo financiamento desse estudo.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no curso de Doutorado da FOUSP .

Antunes TA. Perfil da expressão de genes homeobox em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca estimuladas pelo ácido retinóico [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O carcinoma epidermóide de boca, neoplasia maligna de boca mais comum, pode originar-se de lesões potencialmente malignas. O ácido retinóico, que atua no crescimento e diferenciação celular, tem sido comumente estudado como um possível quimioterápico na prevenção dessa progressão. Embora o mecanismo pelo qual o ácido retinóico previne essa progressão, e promove a parada do crescimento celular, não esteja estabelecido, sabe-se que os genes homeobox são importantes alvos do ácido retinóico durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação tecidual. Este estudo visa determinar se a modulação da expressão desses genes está envolvida na inibição do crescimento pelo ácido retinóico em carcinoma epidermóide de boca. Para isso, foi realizado PCR array para avaliar a expressão de 84 genes homeobox na linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca sensível ao ácido retinóico SSC-25, comparando com a linhagem resistente, SSC-9, após o tratamento com ácido retinóico por sete dias. Os resultados mostraram nove genes com perda de expressão e quatro com alta expressão. A validação por qPCR de 7 desses genes confirmou os resultados. Desses, três genes (ALX1, DLX3, TLX1) foram selecionados para terem a expressão avaliada em amostras tratadas por 3, 5 e 7 dias. O gene ALX1 apresentou baixa expressão apenas no dia 7. O gene DLX3 apresentou baixa expressão no terceiro dia com maior decréscimo no sétimo. Já o gene TLX1, mostrou baixa significativa no quinto dia, com valores semelhantes no

sétimo. Os dados mostram genes homeobox são modulados pelo ácido retinóico em linhagens de carcinoma epidermóide de boca. No entanto, esses genes não parecem ser alvo direto da inibição do crescimento promovida pelo ácido retinóico.

Palavras-Chave: Carcinoma de Células Escamosas; Genes Homeobox; Retinóides

Antunes TA. Expression of homeobox gene in oral squamous cell carcinoma cell lines under retinoic acid stimulus [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma, the most frequent oral cancer, may arise from potentially malignant oral lesions. Retinoic acid, which plays a role in cell growth and differentiation, has been frequently studied as a possible chemotherapeutic agent in the prevention of this progression. While the mechanism by which retinoic acid prevents progression and suppresses cell growth has not been completely elucidated, it is known that homeobox genes represent important targets of retinoic acid during embryogenesis and differentiation. The present study aims to determine if modulation of the expression of these genes is involved in inhibition of OSCC cell growth by retinoic acid. In order to achieve this goal a PCR array was performed to evaluate the expression of 84 homeobox genes in retinoic acid sensitive SCC-25 cells compared to retinoic acid resistant SCC-9 cells following treatment with retinoic acid for 7 days. Results showed that 9 homeobox genes are downregulated and 4 are upregulated by retinoic acid. The validation confirmed these results. Three genes (ALX1, DLX3, TLX1) were selected for having their expression evaluated on samples treated with retinoic acid for 3, 5 and 7 days. Three different patterns of gene expression were observed. Gene ALX1 showed down-regulation only on day 7. Homeobox gene DLX3 showed reduced expression on day 3 and decreased expression on day 7. TLX1 showed a substantial down-regulation on day 5 with similar values on. The data presented show that a number of homeobox genes are

modulated by retinoic acid in oral squamous cell carcinoma cell lines. However, these genes do not appear to be direct targets of growth suppression triggered by retinoic acid.

Keywords: Squamous cell carcinoma; Homebox genes; Retinoids

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5 RESULTADOS	46
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o tratamento do carcinoma epidermóide de boca baseia-se no procedimento cirúrgico e uso de radioterapia complementar. No entanto, esse modelo não tem se mostrado eficiente na redução das taxas de mortalidade. Um dos principais fatores para a dificuldade no tratamento dessa doença é o alto índice de segundo tumores primários e recidivas. Com o objetivo de reduzir esses índices, diversos grupos de pesquisa focaram os seus estudos na busca de substâncias que prevenissem o reaparecimento da doença.

Uma das substâncias que tem sido amplamente testada é o ácido retinóico. Nos ensaios pré-clínicos ele se mostrou capaz de promover parada do ciclo celular e diferenciação celular, reduzindo o potencial agressivo da célula. No entanto, os ensaios clínicos não foram tão promissores. A utilização de altas doses do ácido retinóico é eficaz na redução dos índices de recidiva, porém grande parte dos pacientes acaba abandonando o tratamento devido aos diversos efeitos colaterais. Quando uma baixa dose é administrada, os resultados da prevenção de novas lesões não são promissores. Diante desse impasse, pesquisas que venham esclarecer os mecanismos de ação do ácido retinóico, que até agora não estão completamente estabelecidos, podem fornecer alternativas terapêuticas.

Durante o desenvolvimento embrionário já foi demonstrado que o ácido retinóico é capaz de promover a expressão de diversos genes da família dos homeobox. Esses genes estão envolvidos na diferenciação e definição da identidade celular, sendo que sua expressão já foi relatada em diversas neoplasias malignas, inclusive no carcinoma epidermóide de boca.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de 84 genes homeobox através da técnica de PCR array em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca tratadas com ácido retinóico, para encontrar genes que possam estar envolvidos na inibição do crescimento celular promovida pelo ácido retinóico no carcinoma epidermóide.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, as neoplasias malignas de boca ocupam a oitava posição entre as mais freqüentes no mundo. Entre as neoplasias malignas de boca, o carcinoma epidermóide é a mais comum, representando mais de 90% dos casos. No entanto, a incidência dessa neoplasia varia de acordo com hábitos culturais, como mascar folhas de bétel e tabaco, que fazem com que a taxa de incidência de câncer de boca seja superior em algumas áreas do mundo (WORLD HEALTH REPORT, 2003).

Estatísticas prevêm um total de 23.100 novos casos de câncer de boca para o ano de 2009 nos Estados Unidos, sendo 15.220 entre os homens e 7.890 entre as mulheres. Com relação à sobrevida após 5 anos, observou-se uma taxa de 53% no período de 1975-1977 e 60% entre 1996 e 2004, indicando aumento dessa taxa (JEMAL et al., 2009). Estudos que avaliaram a sobrevida separando casos de cavidade bucal e lábio mostraram que para lesões da cavidade bucal a sobrevida é de 56,70% e 42,6% nos Estados Unidos e na Alemanha, respectivamente (CARVALHO et al., 2005; GUNTINAS-LICHIUS et al., 2009) . No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer previu para o ano de 2008, 14.160 novos casos de câncer de boca, sendo 10.380 entre os homens e 3.780 entre as mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A taxa de mortalidade para neoplasias malignas de boca, no período

de 1979 a 1998, variou de 2,16 para 2,96 a cada 100.000 homens e de 0,48 para 0,70 a cada 100.000 mulheres no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Homens acima dos 50 anos de idade são mais acometidos por essa neoplasia, embora registros atuais revelem um aumento nos casos entre as mulheres e pacientes jovens. As lesões podem acometer qualquer região da boca, porém são mais freqüentes em língua, soalho bucal e lábio. Clinicamente, apresentam aspecto ulcerado, com bordos elevados e endurecidos, fundo necrótico, base infiltrativa e propensão a metástases precoces e extensas. Ao exame histológico, observa-se uma neoplasia epitelial invasiva, exibindo diferentes graus de diferenciação escamosa e infiltração para os tecidos adjacentes (JEMAL et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF TUMOURS, 2005).

A etiologia do carcinoma epidermóide de boca não está completamente estabelecida. Considerando-se que a carcinogênese é um processo que envolve diversos passos, acredita-se que não seja apenas um agente específico o responsável pela formação dessa neoplasia, mas sim uma associação de diversos fatores (NEVILLE et al., 2002). Entre os possíveis fatores, destacam-se o uso de tabaco e álcool, que, quando metabolizados, levam a formação de substâncias capazes de produzir danos ao DNA (DAS; NAGPAL, 2002; HOMANN et al., 1997; KUPER; ADAMI; BOFFETTA, 2002). A participação de vírus na gênese do carcinoma epidermóide de boca ainda é incerta, sendo que alguns estudos sugerem a participação dos vírus HPV e EBV (HERMANN et al., 2004). Deve-se levar em consideração que os casos de carcinoma epidermóide de lábio possuem etiologia diferente dos demais sítios da boca, estando intimamente ligados a radiação ultravioleta, ao contrário das demais lesões (DAS; NAGPAL, 2002; JOHNSON, 2001).

O câncer é uma doença genética, resultado de acúmulo de alterações no DNA que levam a formação de célula com capacidade de proliferação e crescimento autônomos. (CUPERLOVIC-CULF; BELACEL; OUELLETTE, 2005; KIM; CALIFANO, 2004). Para o carcinoma epidermóide de boca ainda não há um perfil molecular definido, devido a sua patogênese complexa e a necessidade de desestabilização de diversos sistemas de controle celular para que ocorra a carcinogênese (SCHLIEPHAKE, 2003). Entre as alterações moleculares já descritas, destacam-se o aumento da expressão protéica do EGFR, TGF- α , ciclina D1, ciclina E, e a amplificação de genes da família ras (GRANDIS; TWEARDY, 1993; RUBIN GRANDIS et al., 1998; SHINTANI et al., 2002). A literatura também relata mutações nos genes TP53 e p16, e que a diminuição de p63 está relacionada à invasão celular (HIGASHIKAWA et al., 2007; LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2002; REED et al., 1996). Estudos recentes descreveram a expressão de micro-RNAs e a presença de células tronco cancerosas em carcinoma epidermóide de boca, o que levanta a possibilidade de novos mecanismos envolvidos na patogênese do carcinoma epidermóide de boca (CHIOU et al., 2008; LIU et al., 2009).

O tratamento do carcinoma epidermóide de boca é realizado em sua maior parte através de cirurgia, seguido por cirurgia e radioterapia combinadas e, raramente, por apenas radioterapia (CARVALHO et al., 2005). Apesar dos trabalhos descrevendo novos marcadores tumorais e de prognóstico, houve pouca mudança na taxa de sobrevida após 5 anos, que se mantém em torno de 50% (KIM; CALIFANO, 2004). Um dos principais problemas do tratamento do carcinoma epidermóide de boca é o desenvolvimento de segundos tumores primários. Já foi demonstrado que pacientes com câncer de boca que têm a doença limitada a um sítio primário apresentam risco de desenvolver segundos tumores primários no trato

aerodigestivo com taxas que variam de 2 a 7% por ano. Com o objetivo essas taxas, o uso de agentes quimioprotetores que bloqueiem ou consigam reverter o processo de carcinogênese, tornaram-se importante foco nas pesquisas do carcinoma epidermóide de boca (RALHAN et al., 2006). Diferentes substâncias têm sido usadas com esse objetivo como, por exemplo, ácido retinóico, α -tocoferol and β -caroteno, embora um protocolo definitivo ainda não tenha sido obtido (RHEE; KHURI; SHIN, 2004).

2.2 Ácido retinóico

Os retinóides fazem parte de uma grande família de moléculas naturais ou sintéticas, derivadas do retinol (vitamina A) que controlam vias de sinalização durante o desenvolvimento embrionário e influenciam a proliferação e a diferenciação de diversos tipos celulares em adultos (MONGAN; GUDAS, 2007).

Como essas moléculas não são naturalmente sintetizadas no organismo, o retinol é obtido através da alimentação. Ele é carregado até as células-alvo através do sangue pelas proteínas ligantes de retinol (RBP). Essas proteínas se ligam a STRAT6, uma proteína transmembrana que promove a entrada do retinol na célula. Uma vez dentro da célula, o retinol se liga a proteína ligante de retinol celular I (CRBPI). Essa proteína é responsável por direcionar o retinol para diferentes enzimas envolvidas no seu metabolismo. Uma dessas enzimas é a lecitina retinol acil transferase (LRAT) que esterifica o retinol em retinil ester, forma de acumulação de retinol nas células. As enzimas ADH1, ADH4, RDH4, RDH5 e P450 promovem

oxidação de retinol em retinal. Em seguida, uma dehidrogenação irreversível catalisada pelas enzimas retinal deidrogenases citossólicas (RALDH1, RALDH2, RALDH3, RALDH4) convertem o retinal em ácido retinóico all-trans (atRA). Assim que o atRA foi formado, um grupo de proteínas ligantes ao atRA celular (CRABPI e CRABPII) transferem o atRA para o núcleo ou para as enzimas citossólicas responsáveis pelo seu catabolismo e eliminação (BULETIC; SOPRANO; SOPRANO, 2006; KAWAGUCHI et al., 2007; MONGAN; GUDAS, 2007). Uma vez no núcleo, o ácido retinóico exerce a sua função através de dois grupos de receptores, receptores de ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóicos (RXRs). Esses receptores apresentam três isoformas cada um (RAR- α , RAR- β , RAR- γ and RXR- α , RXR- β , RXR- γ) que são traduzidas a partir de “splicing” alternativo. Eles atuam como fatores de transcrição ligante-ativados na forma de heterodímeros (RAR/RXR) ou homodímeros (RXR) que se ligam a elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE) presentes na região promotora dos genes alvo (Figura 2.1) (SWIFT et al., 2006).

A capacidade de diferenciação e controle do crescimento celular promovida pelo ácido retinóico foi demonstrada durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos em diversos trabalhos e esses processos ocorrem através de redução da síntese de DNA e aumento no tempo de duplicação celular, com mudanças morfológicas das células. A capacidade de agir em diferentes tipos celulares e em diferentes estágios do desenvolvimento está relacionada à habilidade que o ácido retinóico tem de alterar a expressão diversos tipos de genes, no entanto, ainda não foi encontrado um mecanismo de ação comum (GUDAS, 1992; SOPRANO; SOPRANO, 2002).

Figura 2.1 – Esquema ilustrando o metabolismo do retinol até se converter em ácido retinóico all-trans

Uma importante ação do ácido retinóico é a parada do ciclo celular durante a fase G1 (WU et al., 1997). Foi demonstrado que o ácido retinóico tem a capacidade de aumentar a taxa proteolítica das proteínas ciclina D1 e ciclina E, que atuam na parada do ciclo celular (DIMBERG et al. 2002; FREEMANTLE et al., 2007). O ácido retinóico também promove a parada do ciclo celular através do aumento do nível da proteína p27 em neuroblastomas, carcinomas de pulmão de células pequenas, carcinomas de ovário e melanomas (NILES, 2004; VUOCOLO; SOPRANO; SOPRANO, 2004).

A atuação do ácido retinóico já foi amplamente descrita em carcinoma epidermóide de boca. Em 2000, Hayashi et al. analisaram os efeitos de ácido retinóico 9-cis em seis linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca. Eles observaram que a linhagem que não respondeu ao ácido apresentava baixos níveis de RAR- β , e as linhagens que responderam ao tratamento mostraram mudanças

nas proteínas do ciclo celular como redução de ciclina-D1, cdk4, kinase ativadora de CDK e expressão de p21^{Waf1/Cp1}, p27^{Kip1}, p300, CBP, BAX, Bak e bcl-2. Outro estudo verificou que o ácido retinóico all-trans inibe o crescimento celular em carcinoma epidermóide de boca, com o aumento concomitante da expressão de queratina 13, p21^{Waf1/Cp1} e p27^{Kip1}, e diminuição de COX-2, o que sugere que ocorra diferenciação celular através de mecanismos envolvendo essas proteínas (KURODA et al., 2005). Xiao et. (2006) mostraram que a inibição do crescimento do carcinoma epidermóide de boca promovida pelo ácido retinóico all-trans é dose e tempo dependente e acompanhada por aumento de fosfatase alcalina, indicando que as células passam por um processo de diferenciação celular.

Diversos estudos clínicos utilizando ácido retinóico na quimioprevenção do carcinoma epidermóide de boca já foram realizados. Hong et al. (1986) demonstraram que altas doses de 13-cis ácido retinóico (isotretinoína) foram capazes de diminuir o tamanho de leucoplasias orais. Entretanto, a toxicidade foi alta e 50% dos pacientes que tiveram resposta a medicação, apresentaram recidiva após 3 meses após o término do tratamento. Com o objetivo de reduzir a toxicidade e evitar recidivas, Lippman et al. (1993) trataram pacientes com leucoplasias com altas doses de isotretinoína por 3 meses, seguido por tratamento com baixas doses de isotretinoína ou β -caroteno por 9 meses. Esse protocolo conseguiu estabilizar ou permitir a regressão das lesões. Entretanto, o seguimento dos pacientes não mostrou diferenças no tempo de sobrevida livre de doença.

Com o objetivo de prevenir segundos tumores primários em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, placebo ou doses variadas de isotretinoína foram administrados aos pacientes durante um ano. Após um período de 54 meses 14% dos pacientes do grupo do isotretinoína apresentaram recidiva

contra 31% do grupo placebo, no entanto os efeitos adversos que incluíram ressecamento da pele, conjuntivite e queilite fizeram com que 33% dos pacientes abandonassem o tratamento (BENNER et al., 1994). Um estudo clínico fase III tratou 1190 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, estádios I e II, com baixa dose de isotretinoína (30 mg/dia) ou placebo. Após o acompanhamento por quatro anos, verificou-se que os resultados da prevenção de segundos tumores primários no grupo isotretinoína não foram estatisticamente significantes quando comparados aos resultados do grupo placebo (KHURI et al., 2006).

Os trabalhos da literatura mostram controvérsias entre os resultados obtidos nos estudos pré-clínicos e clínicos e entre os diversos estudos clínicos realizados para a utilização do ácido retinóico na quimioprevenção do carcinoma epidermóide de boca. Diante desse problema, autores sugerem que estudos que envolvam a combinação de ácido retinóico com outras drogas, e que entendam melhor a via de sinalização e os alvos do ácido retinóico, poderão favorecer a utilização clínica dessa droga (FREEMANTLE; DRAGNEV; DMITROVSKY, 2006). Entre os genes alvo do ácido retinóico, destacam-se a família homeobox, em especial os genes HOX.

2.3 Genes homeobox

Genes homeobox representam uma grande família de fatores de transcrição que já foram descritos nos cinco reinos animais e estão fortemente ligados ao desenvolvimento embrionário e diferenciação celular. O termo “homeo” vem do grego e significa similar, parecido. Ele foi inicialmente empregado para nomear um

grupo de genes da *Drosophila*, os genes do complexo homeótico (HOM-C), que eram capazes de causar homeose. Esse fenômeno consiste na transformação de uma estrutura do corpo em outra perfeitamente igual, quando há mutação em genes homeóticos (Figura 2.2) (DE ROBERTIS; OLIVER; WRIGHT, 1990; MARK; RIJLI; CHAMBOM, 1997).

Figura 2.2 – Transformações homeóticas na *Drosophila melanogaster*. (A) *Drosophila* normal, (B) mutação no gene Bithorax que leva a formação de um par de asas a mais e (C) mutação no gene Antennapedia exibindo uma pata no lugar da antena (GRIER et al., 2005)

Os genes dessa família possuem uma sequência de DNA comum de 183pb, denominada homeobox, que codifica uma sequência protéica de 61 aminoácidos chamada homeodomínio. O homeodomínio exibe uma estrutura de três α -hélices que se manteve conservada durante a evolução, e é responsável pela ligação da proteína ao DNA para exercer a função de fator de transcrição. As duas primeiras hélices apresentam-se paralelas entre si e cruzando a terceira, que é a responsável pela ligação ao DNA (ABATE-SHEN, 2002; CILLO et al., 2001; MARK; RIJLI; CHAMBOM, 1997).

Em mamíferos, mais de 200 genes homeobox já foram descritos e eles encontram-se divididos em duas grandes famílias, a dos homeobox agrupados, também chamados de genes HOX, e a dos não agrupados. Os genes *HOX* possuem grande homologia com os genes do complexo HOM-C da *Drosophila melanogaster* e por isso são também genes homeóticos. Até agora, 39 genes HOX já foram

identificados e eles estão agrupados em quatro grupos A, B, C e D, localizados, respectivamente, nos cromossomos 7, 17, 12 e 2. Esses genes controlam a identidade celular e são responsáveis por determinar o posicionamento ântero-posterior no embrião. Eles são expressos de maneira que genes localizados na região 3' são expressos primeiro e em regiões anteriores do embrião, enquanto genes mais a 5' são expressos mais tardiamente durante o desenvolvimento, e em áreas mais posteriores (Figura 2.3) (DEL BENE; WITTBRODT, 2005; GRIER et al., 2005; HOEGG; MEYER, 2005).

Figura 2.3 –Conservação das famílias de genes HOM-C em *Drosophila melanogaster* e HOX em humanos. Em humanos há 4 “clusters” de genes HOX que surgiram a partir de duplicação e divergência dos genes do complexo HOM-C da *Drosophila*. Esses genes são expressos seguindo colinearidade espacial e temporal, sendo que genes da região 3' são expressos primeiro e na parte anterior do embrião. (GRIER et al., 2005)

A classe dos homeobox não agrupados é formada por um número de genes superior aos HOX, e tem aumentado com a freqüente descoberta de novos genes. A característica marcante deles é a combinação do homeodomínio com outros

domínios, o que dá origem a subfamílias de genes homeobox, e contribui para a especificidade de ligação ao DNA (DEL BENE; WITTBRODT, 2005). Esses genes apresentam-se dispersos pelo genoma e, assim como os HOX, os homeobox não agrupados também apresentam homologia com genes da *Drosophila*. Entre esses genes podemos citar: os PAX, os MSX, os EMX, os OTX e os DLX, que são homólogos, respectivamente, ao paired, muscle segment homeobox, empty spiracles, orthodenticle e distal-less (Figura 2.4) (CILLO et al., 2001).

Figura 2.4 – Os genes HOX são formados por 2 exons e 1 intron. O exon 2 possui uma sequência com 183 pares de base que codifica uma proteína de 61 aminoácidos, o homeodomínio, responsável pela interação com o DNA. Os genes LIM, MSX, PAX e SIX são exemplos de homeobox não agrupados e possuem, além do homeodomínio, domínios adicionais (GRIER et al., 2005)

As homeoproteínas atuam como fatores de transcrição graças a sua ligação ao DNA através da sequência de bases TAAT, e podendo agir tanto como ativadores quanto como repressores da transcrição. Até agora, pouco se sabe sobre os genes alvo dos homeobox e isso se deve em grande parte pela capacidade seletiva que essas proteínas têm *in vivo*. Acredita-se que a especificidade das

homeoproteínas esteja ligada, além de sua seqüência, a diversos níveis de regulação, incluindo controle pós-transcricional, transporte núcleo-citoplasma e interações entre proteínas (Figura 2.5) (ABATE-SHEN, 2002). Entre os cofatores que interagem com os homeobox, destacam-se o papel de duas famílias de homeobox, a PBX e MEIS, que já foram descritos como importantes proteínas na interação com outros homeobox (CHARBONEAU et al., 2005; FERNANDEZ; GUDAS, 2009; SARNO; KLIMAN; TAYLOR, 2005).

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

Por participarem tão intensamente do processo de proliferação e diferenciação celular, acredita-se que os genes homeobox tenham um grande envolvimento com o controle do ciclo celular e apoptose e por essa razão, a interação dos homeobox com esses processos vem sendo fortemente estudada (Figura 2.5) (CILLO et al., 2001; DEL BENE; WITTBRODT, 2005; FORD, 1998; MORETTI; COSTANZO, 2009; RADOJA et al., 2007). O HOX11/TLX1 é capaz de anular o ponto de checagem da divisão celular na fase G2 através da interação com

a proteína fosfatase 2A (FORD, 1998; CILLO et al., 2001). O gene PITX2 é capaz de induzir a expressão de genes controladores da fase G1 do ciclo celular, como ciclina D1, D2 e c-Myc (BAEK et al., 2003). Acredita-se que os genes MSX sejam capazes de inibir a diferenciação celular impedindo que a célula saia do ciclo celular. Esse modelo pode ser comprovado em camundongos com defeitos na diferenciação em células epiteliais e mesenquimais da glândula mamária, que têm expressão aumentada de Msx1 e que tiveram um aumento na ciclina D1 e CDK4 (HU et al., 2001). A proteína p63, que é um fator de transcrição homólogo ao p53 e p73, possui seis diferentes isoformas que estão intimamente relacionadas a expressão do homeobox DLX3. A isoforma TAp63 α ativa e TAp63 γ reprime a transcrição do DLX3. O DLX3 por sua vez, promove a fosforilação da Raf1 que promove a ubiquitinização da isoforma Δ Np63 α (DI COSTANZO et al., 2009; MORETTI; COSTANZO, 2009; RADOJA et al., 2007).

Figura 2.5 – Genes Homeobox e os seus alvos no ciclo celular. As linhas azuis indicam ativação ou repressão direta, as linhas vermelhas mostram interação proteína-proteína, as linhas verdes mostram ativação ou repressão indireta e as linhas pretas indicam interações que ainda não se mostraram como diretas (DEL BENE; WITTBRODT, 2005)

2.3.1 Genes homeobox e ácido retinóico

Os mecanismos envolvidos na expressão dos genes homeobox ainda não estão esclarecidos. No entanto, estudos envolvendo desenvolvimento de embriões de camundongos levaram a identificação do ácido retinóico como um possível ativador dos genes HOX.

O estudo de 33 genes HOX na linhagem celular de carcinoma embrionário NT2/D1 induzida por ácido retinóico para promover diferenciação celular, revelou que 22 genes tiveram um aumento de expressão em células tratadas com ácido retinóico a 10 μ M por 14 dias. Também foi observado que os 11 genes, cujos níveis de expressão se mantiveram indetectáveis após o tratamento, se localizavam na região 5' de cada grupo de genes HOX. De acordo com os resultados, os autores propuseram que os genes HOX são diferentemente ativados pelo ácido retinóico nessas células de acordo com a sua localização nos diferentes grupos de genes HOX (STORNAIUOLO et al., 1990).

Quando a expressão dos genes HOX foi analisada nas linhagens celulares NT2/D1 e TERA2/clone13 induzidas por ácido retinóico em concentrações de 10⁻⁵ e 10⁻⁷ M, durante períodos que variaram de 1h a 180h, diferentes padrões de expressão gênica foram observados. Genes localizados na região 3' foram inicialmente ativados e a ativação ocorreu de forma colinear no locus. Genes localizados na região 5' não apresentaram ativação pelo ácido retinóico. Também foi observado que alguns genes tiveram padrões de expressão diferentes. HOXC13, D10, D11, D12 e D13 apresentavam uma baixa expressão em células não tratadas

com ácido retinóico e que foi progressivamente reduzida com o tratamento. Esses resultados indicaram que existem 3 grupos de genes HOX. O primeiro grupo apresenta aumento da expressão dos genes com o estímulo das células com ácido retinóico, o segundo não apresenta mudanças na expressão e o terceiro exibe baixa da expressão. Segundo os autores, essas diferenças indicam que o ácido retinóico é capaz de alterar a expressão dos genes HOX, mas não de ativá-los inicialmente (SIMEONE et al., 1990; 1991).

Estudos com a linhagem celular de teratocarcinoma humano NT2/D1 demonstraram que muitos genes HOX são estimulados por ácido retinóico. Já foi observado que existe uma correspondência entre a localização do gene e a sua resposta ao estímulo por ácido retinóico. Genes HOX localizados próximo a região 3' são induzidos rapidamente e por baixas concentrações de ácido retinóico, e a medida que a distância da região 3' aumenta, aumenta também o tempo e a concentração para a indução por ácido retinóico (LANGSTON; GUDAS, 1994; SIMEONE et al., 1991).

As evidências da influência do ácido retinóico na expressão dos genes homeobox levaram diversos grupos a investigarem a existência de elementos responsivos de ácido retinóico (RARE) nos genes homeobox. O estudo da região promotora do HOXA1 identificou a presença de um sítio RARE localizado a jusante do promotor do gene, e que auxilia na modulação da sua expressão (LANGSTON; GUDAS, 1992). Estudos semelhantes foram realizados para HOXB1, HOXD4, CDX1 e MSX1 e identificaram a presença de RARE também para esses genes (HOULE; SYLVESTRE; LOHNES, 2003; MORONI; VIGANO; MAVILIO, 1993; OGURA; EVANS, 1995; SHEN et al., 1994).

2.3.2 Homeobox genes e cancer

Durante a carcinogênese diversos genes homeobox apresentam-se alterados, tanto para ganho quanto para perda de função (FORD, 1998). Entre os genes que apresentam ganho de função podemos citar o HOXB7 que promove proliferação celular através da ativação do bFGF em melanoma (CARE et al., 1996). O homeobox SIX1 foi detectado em diversas linhagens celulares, incluindo linhagens celulares de carcinoma mamário primário e metastático. Esse gene também tem aumento da sua expressão em rabdomiossarcomas, sendo correlacionado com a formação de metástases. Durante a hematopoiese, a expressão de HOXA10 foi relatada em células precursoras mielóides e, em camundongos, a sua superexpressão leva a proliferação celular (DEL BENE; WITTBRODT, 2005).

A família de genes PAX é, entre os homeobox, a que apresenta uma associação com a oncogênese melhor estabelecida. O gene PAX5 possui expressão alterada em glioblastoma e meduloblastoma, além de estar envolvido na translocação t(9;14) na leucemia linfoplasmocitóide. O PAX2 e o PAX8 foram detectados no tumor de Wilms e o PAX3 está associado à diferenciação anormal de melanócitos (CILLO et al., 2001).

O gene CDX2, que é expresso no intestino durante o desenvolvimento e também na fase adulta, é um exemplo de homeobox que tem expressão diminuída em linhagens celulares de carcinoma (EE et al., 1995). De forma semelhante ao CDX2, o NKX3 é expresso nos estágios iniciais da formação da próstata até a idade adulta, e é necessário para a diferenciação do epitélio da próstata. Camundongos

com mutações homozigóticas ou heterozigóticas nesse gene desenvolvem uma lesão pré-maligna chamada neoplasia epitelial prostática. Embora essa lesão não progrida para um carcinoma por si só, ela acelera a progressão maligna em colaboração com a perda de função do gene supressor de tumor PTEN (ABATE-SHEN, 2002).

Campo Dell'Orto et al. (2007) demonstraram que o DLX3 pode ser útil na distinção de dois tipos de leucemia. Eles verificaram que na leucemia linfoblástica aguda B t(4;11) (q21;q23) há alto nível de metilação e baixa expressão do DLX3, enquanto na leucemia linfoblástica aguda B t(12;21) (p13;q22) e nos controles sem translocação, o nível de metilação era baixo e o de expressão alto. Outro gene homeobox que apresenta sua metilação ligada a progressão tumoral é o TLX1 em carcinoma ductal de mama (TOMMASI et al., 2009).

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

Apenas dois trabalhos na literatura que verificaram o perfil de genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca. Um deles foi realizado por Hassan et

al. (2006) que avaliaram os níveis de expressão de transcritos dos 39 HOX em mucosa normal, displasia e carcinoma epidermóide de boca. Eles verificaram que 18 genes (HOXA1, A2, A3, A5, A9, B3, B6, B7, B9, C4, C6, C8, C9, C11, C13, D9, D10 e D11) apresentaram níveis de expressão diferentes entre mucosa normal, displasias e carcinoma epidermóide, sendo que todos eles apresentavam expressão superior no carcinoma quando comparados com a mucosa normal. Os genes HOXA2, A3, B3 e D10 estavam mais expressos em displasias que na mucosa normal, no entanto não houve diferença na expressão entre displasias e carcinomas. No entanto, as displasias apresentavam níveis de expressão inferiores para os genes HOXA1, B7 B9 e C8 quando comparados ao carcinoma. Segundo os autores, esses dados sugerem que a alteração na expressão de genes HOX pode estar implicada na patogênese de displasias bucais e carcinoma epidermóide.

O segundo trabalho, desenvolvido por Zhu et al. (2004) verificou a expressão do gene homeobox QUOX1 em carcinomas epidermóide de boca. Os autores observaram que não há expressão do gene em tecido adjacente não tumoral, mas sim em tecidos displásicos e no carcinoma. Segundo os autores, esses achados sugerem que QUOX1 poderia funcionar como um marcador biológico de malignidade e de proliferação do carcinoma epidermóide de boca.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos do tratamento com ácido retinóico all-trans na expressão de gene homeobox em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca. Para atingir essa meta, os seguintes objetivos específicos são propostos:

1. Realizar PCR array para 84 genes homeobox utilizando linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca tratadas com ácido retinóico.
2. Validar os resultados obtidos no PCR array para os genes que apresentaram perda de expressão, utilizando a técnica da PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Temple University sob a supervisão do Prof. Dr. Kenneth J. Soprano e da Prof. Dra. Dianne R. Soprano.

4.1 Linhagens celulares

As linhagens de carcinoma epidermóide humano de língua SCC-9 e SCC-25 foram obtidas na American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). As linhagens SCC-9 e SCC-25 foram isoladas de pacientes de 25 e 70 anos de idade, respectivamente, e os tumores foram detectados menos de três meses antes da biópsia utilizada para a cultura de células. Os pacientes não foram submetidos a nenhum tratamento para os tumores antes da biópsia utilizada para a cultura de células (RHEINWALD; BECKETT, 1981).

4.2 Cultura de células

As linhagens celulares foram mantidas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetil sulfoxido (DMSO – Sigma, St. Louis, MO, USA) para estoque de longo prazo. Quando necessário, as células foram descongeladas em banho de água a 37°C por 2 min, sendo em seguida transferidas para um tubo Falcon de 15ml contendo 10ml de uma mistura 1:1 de meio de Eagle modificado por Dulbecco e de meio Ham F-12 (DMEM/F-12) (GIBCO; Carlsbad, California, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Mediatech Cellgro, Herndon, VA, USA), 2mM L-glutamina (HyClone; Logan, UT, USA), 100U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina (Mediatech Cellgro, Herndon, VA, USA) e, então, centrifugado a 130xg por 5 minutos a 4°C (Brinkmann Eppendorf; Westbury, NY, USA). O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células dissolvido em 10ml de meio de cultura DMEM/F-12 (GIBCO; Carlsbad, California, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Mediatech Cellgro, Herndon, VA, USA), 2mM L-glutamina (HyClone; Logan, UT, USA, 100U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina (Mediatech Cellgro, Herndon, VA, USA) e cultivado em placas para cultura de célula de 100mm a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram monitoradas em microscópio de fase e o meio foi trocado a cada dois dias, dependendo do crescimento celular, até que as células atingissem a confluência. As células foram passadas quando atingiram a confluência de 100% e para isso, o meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS)1X estéril pH7.2 e adicionado 2ml de tripsina 1X (GIBCO, Invitrogen Corporation; Carlsbad, California, USA). As placas foram

mantidas a 25°C até as células se destacarem e então, 5ml de meio de cultura DMEM/F-12 suplementado conforme descrito anteriormente, foi adicionado para a inativação da enzima. As células em suspensão foram transferidas para um tubo Falcon de 15 ml, centrifugadas 130xg por 5 minutos a 4°C (Brinkmann Eppendorf; Westbury, NY, USA) e subcultivadas em uma taxa de 1:10.

A contagem celular foi realizada utilizando-se hemocítômetro. Células tripsinizadas e em suspensão em meio de cultura DMEM/F-12 foram misturadas na taxa de 1:1 com 0.4% de azul de tripan (GIBCO, Invitrogen Corporation; Carlsbad, California, USA) e 10µl da suspensão foi colocado no hemocítômetro. Todas as contagens celulares foram realizadas em triplicata.

4.3 Ácido retinóico

Ácido retinóico all-trans (atRA) na forma de pó foi gentilmente fornecido por Hoffmann-LaRoche, Inc. (Nutley, NJ, USA) e mantido protegido de luz em freezer - 20°C. A cada 3 semanas, soluções estoque de ácido atRA diluído em etanol na concentração de 10^{-3} M foram preparadas e estocadas a -20°C, protegidas de luz. Para a determinação exata da concentração das soluções de estoque, a densidade óptica das soluções foi verificada através de leitura em espectrofotômetro (Beckman - Du 640; Fullerton, CA, USA) na absorbância de OD350nm.

4.4 Curva de crescimento

Para a análise quantitativa da proliferação celular após o tratamento das linhagens celulares SCC-9 e SCC-25 com atRA, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas para cultura de célula de 100mm e incubadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, como previamente descrito, por 24 horas. Após esse período, solução de estoque de atRA foi adicionado ao meio de cultura afim de atingir a concentração de 10^{-6} M que já havia sido previamente estabelecida como ideal (SOPRANO; SOPRANO, 2002). O meio de cultura celular foi trocado a cada 2 dias e o atRA readicionado. A contagem celular foi realizada nos dias 1, 3, 5 e 7, com o objetivo de definir o melhor período para tratamento dessas linhagens com ácido retinóico. Culturas celulares controle foram tratadas com etanol pelo mesmo período e seguindo os mesmos procedimentos descritos para o ácido retinóico. Todos os procedimentos foram realizados protegidos de luz e em triplicata.

4.5 PCR array

4.5.1 Extração de RNA

As linhagens celulares SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com ácido retinóico e com etanol por 7 dias como descrito para a curva de crescimento. Após o

tratamento com atRA, as células foram lavadas com PBS1X, tripsinizadas e contadas. A extração de RNA foi realizada com o kit RT² qPCR-Grade RNA Isolation Kit (SABiosciences; Frederick, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante e como recomendado pelo protocolo para PCR array.

Para a extração de RNA, 350µl de tampão Lysis and Binding foi homogeneizado com 8×10^5 células. Essa mistura foi transferida para uma coluna de filtragem e centrifugada por 1min a 11.000xg. Ao filtrado, foram adicionados 350µl de etanol 70% e a mistura transferida para uma coluna de centrifugação. Depois da coluna ser centrifugada por 30s a 11.000xg, ela recebeu 350µl de tampão Desalting e passou por nova centrifugação por 1min a 11.000xg. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores. Uma mistura com 10µl of DNase livre de RNase e 90µl de tampão da reação de DNase foi adicionada à coluna de centrifugação e deixada incubar por 15min. Após esse período, 200µl do tampão de Pre-salting foi adicionado à coluna de centrifugação, que passou por nova centrifugação por 30s a 11.000xg. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e a ela, adicionado o tampão Washing seguido por centrifugação por 30s a 11.000xg. Para a diluição do RNA, 50µl de água livre de RNase foram adicionados a coluna de centrifugação que passou por centrifugação por 1min a 11.000xg.

A quantidade e pureza do RNA foram avaliadas utilizando-se um espectrofotômetro (Beckman - Du 640; Fullerton, CA, USA). Para essa análise, 4µl de RNA foram diluídos em 996µl de água e a absorbância óptica foi obtida. A concentração de RNA (µg/µl) foi calculada utilizando a fórmula $(OD_{260} \times 40\mu g)/4$. A pureza foi determinada através da proporção OD_{260}/OD_{280} , que exibiu valores entre 1.9 e 2.1. Todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -70°C.

4.5.2 Síntese de cDNA pela técnica da transcriptase reversa

A síntese de cDNA foi realizada com o kit RT² First Strand Kit (SABiosciences; Frederick, MD, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra, 2µg de RNA foram adicionados a 2µl de tampão 5x de eliminação de gDNA e água livre de RNase para um volume final de 10µl. A mistura foi mantida a 42°C por 5min, seguido por resfriamento em gelo por, pelo menos, 2min. O coquetel para RT-PCR foi preparado com 4µl de tampão para RT3, 1µl de controle para primer, 2µl de mix de enzima para RT3 e 3µl de água livre Rnase. O coquetel foi adicionado à mistura inicial e incubado a 42°C por 15min e 95°C por 5min. O produto da reação de RT-PCR foi diluído em 91µl água duplamente destilada e mantido a -20°C.

4.5.3 PCR array

Antes da reação de PCR array, todas as amostras foram submetidas a reação de PCR para o controle endógeno tubulina, utilizando-se iniciadores inter exons, com o objetivo de avaliar a qualidade das amostras a existência de contaminação por DNA genômico (Tabela 4.1). A reação de PCR foi dividida em duas etapas. Para a reação de pré-PCR, 2,5µl de cDNA e 100nM de cada iniciador foram misturados em um tubo de 0,5µl e mantidos a 95°C por 2min. O mix para a reação de PCR foi

preparado para uma reação com um volume total de 50µl utilizando-se 10µl de 5XGreen GoTaq® Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 3µl de solução de MgCl₂ na concentração de 7.5mM (Promega, Madison, WI, USA), 2µl de PCR Nucleotide Mix (dNTP) (10mM cada), 0.25µl de GoTaq®DNA Polymerase(5u/µl) (Promega, Madison, WI, USA) e água para 50µl. A ciclagem da reação de PCR consistiu de uma etapa inicial de 95°C por 1min, seguida de 30 ciclos a 95°C por 30s, 54°C por 30s e 72°C por 30s, e um período de extensão final a 72°C por 5min.

Tabela 4.1 – Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação da tubulina

<i>Gene</i>	<i>Número de acesso</i>	<i>Iniciadores 5'→ 3'</i>	<i>Posição</i>	<i>Produto</i>
TUBB2A	NM_001069	Senso: CTGGCACCATGGACTCTG	295-312	124
		Anti-senso: TCGGCTCCCTCTGTGTAG	418-401	

O produto da reação de PCR foi avaliado em gel de acrilamida a 10% preparado com 3ml de solução de 30%Acrilamida/0.8% Bis Acrilamida, 2ml de solução de TBE 5X, 100µl de AP 10%, 5 µl de TEMED e 4.9ml de água (Figura 4.1).

Figura 4.1 –Gel de acrilamida 10% com o resultado para a reação de PCR para o controle endógeno tubulina com amostras utilizadas para PCR array. C-= controle negativo; 9 Et= linhagem celular SCC-9 tratada com etanol; 9 RA=linhagem celular SCC-9 tratada com ácido retinóico; 25 Et=linhagem celular SCC-25 tratada com etanol; 25 RA=linhagem celular SCC-25 tratada com ácido retinóico

As reações de PCR array foram realizadas com o kit RT² profiler PCR Array System (SABiosciences; Frederick, MD, USA) para 84 genes homeobox de acordo

com o protocolo do fabricante. O mix para as reações de PCR em tempo real (qPCR) para o PCR array foram preparadas com 1.275µl 2X SABiosciences RT² qPCR Master Mix (SABiosciences; Frederick, MD, USA), 102µl de cDNA diluído e 1.173µl de água duplamente destilada. O mix foi vortecado e 25µl da solução distribuída em cada um dos 96 poços da placa de PCR array que já continham os iniciadores de interesse. Além dos 84 genes homeobox analisados por esse estudo, as placas de PCR array continham 5 diferentes controles endógenos, um controle para contaminação por DNA genômico, controle da transcriptase reversa e controle positivo para PCR. A distribuição dos genes analisados e dos controles na placa de PCR array pode ser observada no anexo B e a lista completa com a informação de cada gene pode ser acessada no website da SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-083A>). O equipamento utilizado para as reações de qPCR foi Applied Biosystems 7500 PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as condições de ciclagem foram: 95°C por 10min e 40 ciclos com temperatura de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto, seguido pelo período de dissociação. Todos os procedimentos foram realizados utilizando-se triplicata das amostras.

4.6 Validação por qPCR

4.6.1 Extração de RNA

As linhagens celulares SSC-9 e SCC-25 foram tratadas com atRA e etanol da forma previamente descrita e o RNA foi extraído de amostras tratadas por 3, 5 e 7 dias. Após o tratamento com atRA, as células foram lavadas com PBS1X, destacadas das placas de cultura por meio de tripsina 1X (GIBCO) e contadas. A extração de RNA foi realizada com a solução RNA-Bee (Iso-Tex Diagnostics, Inc – Friendswood, TX, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O precipitado de células foi homeogeneizado em 1ml de RNA-Bee, seguido pela adição de 200µl de clorofórmio. A suspensão foi vigorosamente agitada e mantida em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000xg por 15min a 4°C. A fase aquosa sobrenadante foi transferida para novo tubo de 1,5ml e a ela foi adicionado 500µl de isopropanol. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e, então centrifugadas a 12.000xg por 5min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA foi lavado com etanol 70%, seguido por nova centrifugação a 7.500xg por 5min a 4°C. O sobrenadante formado foi descartado e o precipitado de RNA formado diluído em água duplamente destilada. A quantidade e pureza de RNA foram analisadas da forma previamente descrita e as amostras mantidas em freezer -70%.

4.6.2 Síntese de cDNA através do uso da transcriptase reversa

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o kit RT-PCR First strand cDNA synthesis (BD Biosciences, Clontech Laboratory Inc., Mountain View, CA, USA). Em um tubo de 0,5ml foram adicionados 1µg de RNA total, 1µl de oligo dT

primer e água livre de RNase para obter um volume total 12,5µl. Os reagentes misturados apropriadamente e incubados a 70°C por 2min. Um mix contendo 4µl de tampão da reação 5X, 1µl de mix de dNTP (10mM each), 1µl da transcriptase reversa MMLV e 0.5µl de inibidor de RNase foi preparado para cada reação. O mix foi adicionado a cada tubo, misturado adequadamente, e incubado a 4°C por 1h e, então, a 94° C por 5min para inibir a atividade de DNase. O cDNA obtido foi diluído em 80µl de água DEPC para a obtenção de um volume final de 100µl e estocado em freezer -20°C até o momento de uso.

4.6.3 qPCR

Conforme realizado para as amostras utilizadas para o PCR array, todas as amostras utilizadas para a validação e análise através do tempo foram submetidas a reação de PCR para o controle endógeno tubulina, conforme descrito anteriormente e os resultados obtidos foram similares.

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7500 PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em placas ópticas de 96 poços e utilizando o método de SYBR green. As seqüências dos iniciadores utilizados nesse trabalho foram obtidas no Primer Bank (PRIMER BANK, 2009; SPANDIDOS et al., 2008; WANG, SEED, 2003). O iniciador do gene DLX6 foi obtido através da SABiosciences (Frederick, MD, USA) sob o número de catálogo PPH15032A. As seqüências dos iniciadores podem ser observadas na tabela 4.2 e

todos os produtos de PCR tiveram as suas curvas de dissociação analisadas e apresentaram pico único para todos os iniciadores.

Tabela 4.2 – Iniciadores utilizados para as reações de PCR em tempo real

Gene	Número de acesso	Iniciadores 5'→3'	Posição	Produto
ALX1	NM_006982	Senso: AATGTCTCCCGTGAAAGGGAT Anti-senso: GTTCGGTGCCTCCGTTTCTTA	313-333 414-394	102
DLX3	NM_005220	Senso: TTA CTGCCCCAAGTCGGAATA Anti-senso: AGTAGATTGTACGCGGCTTTC	463-483 635-615	173
DLX6	NM_005222	-----	-----	66
HLX	NM_021958	Senso: CAGGTCCCTATGCTGTGCTC Anti-senso: GCTTGGTCACGTACTTCTGAAT	1212-1231 1352-1331	141
HOPX	NM_139211	Senso: GACAAGCACCCGGATTCCA Anti-senso: GTCTGTGACGGATCTGCACTC	226-244 372-352	147
HPRT	NM_000194	Senso: TTCTTTGCTGACCTGCTGG Anti-senso: TCCCCTGTTGACTGGTCAT	305 -323 423-405	119
SIX3	NM_005413	Senso: AAGAGTTGTCCATGTTCCAGC Anti-senso: GGATCGACTCGTGTTTGTGGA	431-451 601-581	171
TLX1	NM_005521	Senso: CACGCAGAGCCCATTAGCTT Anti-senso: GGCCGTATTCTCCGTCCTG	1055-1074 1157-1139	103

Para cada amostra, um mix contendo 15µl de cDNA, 50µl de SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 200nM de cada iniciador e água duplamente destilada para uma volume total de 100µl foi preparado e adequadamente misturado. 30µl do mix foi distribuído em 3 diferentes poços com o

objetivo de obter a triplicata. A ciclagem usada para as reações de PCR em tempo real foi: 50°C por 2min, 95°C por 10min e 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 40s e 68°C por 40s. Todos os procedimentos foram realizados em utilizando-se triplicata das amostras.

4.7 Análise dos dados e estatística

Todas as análises das reações de PCR em tempo real foram realizadas através de quantificação relativa baseada no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para as reações de PCR array, a média dos valores de C_t obtida para os controles endógenos em cada placa foi utilizado para o cálculo do ΔC_t e para as reações de qPCR, o controle endógeno foi o HPRT. A diferença de expressão foi avaliada entre os grupos etanol e ácido retinóico para cada linhagem celular. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são indicados em média e desvio padrão. Teste t de Student foi utilizado para avaliar a significância da diferença e valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em subtítulos com o objetivo de facilitar o entendimento dos dados obtidos nas diferentes fases desse estudo.

5.1 Curva de crescimento celular

Foram realizadas curvas de crescimento celular para as linhagens celulares de carcinoma epidermóide SCC-9 e SCC-25 tratadas com ácido retinóico all-trans (atRA) na concentração de 10^{-6} M e o mesmo volume de etanol pelo período de sete dias. A linhagem celular SCC-9 apresentou um número de células semelhante nos grupos etanol e ácido retinóico em todos os dias de contagem celular, como pode ser observado na figura 5.1. Considerando que similar número de células foi observado para ambos os grupos, o resultado do cálculo da taxa de inibição de crescimento celular mostrou que não há inibição estatisticamente significativa (Figura 5.2). De acordo com esses dados, a linhagem celular SCC-9 foi considerada como não responsiva ao tratamento pelo ácido retinóico.

Figura 5.1 – Gráfico dos resultados da curva de crescimento celular da linhagem celular SCC-9 mostrando o número de células em cada dia de análise das amostras tratadas com ácido retinóico e etanol

Figura 5.2 – Gráfico da taxa de inibição de crescimento celular para a linhagem SCC-9 tratada com ácido retinóico com relação ao controle com etanol

A curva de crescimento celular da linhagem celular SCC-25 mostrou crescimento celular mais lento quando tratada com ácido retinóico em comparação com o controle com etanol (Figura 5.3). Essa inibição do crescimento celular aumento com o passar do tempo, chegando ao nível máximo no dia 7 com inibição de 42,11% (Figura 5.4). Esses resultados indicam que a linhagem celular SCC-25 é responsiva ao tratamento por ácido retinóico all-trans e, portanto, pode ser utilizada para as análises por PCR array.

Figure 5.3 – Gráfico dos resultados da curva de crescimento celular da linhagem celular SCC-25 mostrando o número de células em cada dia de análise das amostras tratadas com ácido retinóico e etanol. — Valor de $P < 0.01$

Figure 5.4 – Gráfico da taxa de inibição de crescimento celular para a linhagem SCC-25 tratada com ácido retinóico com relação ao controle tratado com etanol. * = Valor de $P < 0.01$

5.2 PCR array

5.2.1 Tratamento das células com ácido retinóico all-trans

Baseado nos resultados obtidos para nas curvas de crescimento celular, as linhagens SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com ácido retinóico a $10^{-6}M$ por 7 dias e

a média da taxa de inibição de crescimento obtida para os três grupos de amostras utilizadas para o PCR array foi de 6,5% para a SCC-9 e 43.4% para a SCC-25 (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Gráfico com as taxas de inibição de crescimento celular das linhagens celulares SCC-9 e SCC-25 das amostras usadas no PCR array

5.2.2 Controles

Para todas as placas de PCR array realizadas, controles para contaminação com DNA genômico e de transcriptase reversa foram avaliados e os resultados estavam de acordo com as condições ótimas para o sucesso das reações de PCR array (Anexo C).

As placas de PCR array contêm os controles endógenos B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH e ACTB. Os valores de Cts obtidos para cada controle endógeno, em cada reação realizada, podem ser observados na tabela 5.1 para a SCC-9 e na tabela 5.2 para a SCC-25. Considerando-se que a variação dos valores de Ct de cada gene, entre os dois grupos estudados (etanol e ácido retinóico) não foi crítica, todos os genes estudados foram considerados como adequados para serem usados

como controles endógenos e a média de Ct desses genes foi utilizada como controle endógeno, conforme sugestão do fabricante.

Tabela 5.1 – Tabela com os valores de Cts obtidos para cada controle endógeno em cada PCR array da linhagem SCC-9, média dos Cts para todos os genes em cada experimento e média de Cts de cada gene em todos os experimentos. Exp = experiment, DP = desvio padrão

Símbolo do gene	Poço	Ácido retinóico			Etanol			Média cada gene	DP
		exp1	exp2	exp3	exp1	exp2	exp3		
B2M	H01	16.38	17.77	17.05	16.19	18.03	16.80	17.04	0.74
HPRT1	H02	19.39	20.70	20.18	19.68	20.99	19.93	20.15	0.61
RPL13A	H03	18.00	19.47	19.05	18.15	20.20	18.82	18.95	0.82
GAPDH	H04	15.15	16.15	15.73	15.40	17.30	15.70	15.91	0.76
ACTB	H05	16.01	17.12	16.46	15.74	17.33	16.32	16.50	0.62
-----	Média cada exp	16.99	18.24	17.69	17.03	18.77	17.51	-----	-----
-----	DP	1.70	1.83	1.86	1.82	1.71	1.79	-----	-----

Tabela 5.2 – Tabela com os valores de Cts obtidos para cada controle endógeno em cada PCR array da linhagem SCC-25, média dos Cts para todos os genes em cada experimento e média de Cts de cada gene em todos os experimentos. Exp = experiment, DP = desvio padrão

Símbolo do gene	Poço	Ácido retinóico			Etanol			Média cada gene	DP
		exp1	exp2	exp3	exp1	exp2	exp3		
B2M	H01	16.05	15.81	15.55	14.11	15.06	14.82	15.23	0.72
HPRT1	H02	20.60	20.54	20.30	19.76	20.79	20.62	20.44	0.37
RPL13A	H03	18.19	18.02	17.97	18.07	19.12	18.90	18.38	0.50
GAPDH	H04	16.15	16.01	16.02	15.09	16.55	16.33	16.02	0.50
ACTB	H05	16.08	16.46	17.68	15.24	17.17	16.60	16.54	0.85
-----	Média cada exp	17.41	17.37	17.50	16.45	17.74	17.45	-----	-----
-----	DP	2.00	1.97	1.88	2.37	2.24	2.29	-----	-----

5.2.3 SCC-9

A análise de valores de Ct obtidos nos três PCR arrays realizados para a linha SCC-9 mostraram uma média de 9 genes com Ct menor que 25 no grupo etanol e 10 no grupo do ácido retinóico. Para Cts variando entre 25 e 35, foram observados 51 genes no grupo etanol e 50 no grupo ácido retinóico. Para valores de Ct acima de 35, foram identificados 24 genes do grupo etanol e 24 do grupo do ácido retinóico (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Gráfico exibindo as variações dos valores de Ct para 84 genes homeobox no PCR array da linhagem celular SCC-9

De acordo com os parâmetros para PCR array, genes com valores de Ct inferiores a 25 são considerados altamente expressos, enquanto genes com valores de Ct acima de 35, fracamente ou não expressos. Com o objetivo de avaliar quais genes pertencem a cada uma dessas categorias para a linhagem SCC-9, os valores de Ct de cada gene foram avaliados nos dois tipos de amostras estudadas (etanol e ácido retinóico). Genes que apresentaram média de valores de Ct para os dois tipos de amostras dentro do mesmo grupo (abaixo de 25 ou a cima de 35) foram considerados como pertencentes aquele grupo e, portanto, alto ou fracamente expressos. Para o grupo de genes de baixa expressão na linhagem celular SCC-9, foram observados 24 genes, enquanto para o grupo de genes de alta expressão, 9. Esses resultados podem ser observados na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Tabela com os genes que não estão expressos e genes que estão altamente expressos na linhagem celular SCC-9

Genes com baixa expressão na SCC-9		Genes com alta expressão na SCC-9
ALX4	OPT	CUX1
ARX	OTX2	HOXB7
BARX1	PAX3	HOXB9
CDX1	PHOX2B	HOXC10
CDX2	PITX3	PDHX
DLX5	PROP1	PITX1
DRGX	SHOX	PITX2
EN1	SIX3	SHOX2
HOXB1	SIX6	SIX4
HOXC12	TLX1	---
LBX1	VAX1	---
LMX1A	VSX1	---

A análise dos resultados do PCR array foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que como controle endógeno foi utilizada a média dos valores de Ct obtidos para os cinco controles endógenos da placa de PCR array e como calibrador, as amostras tratadas com etanol. Resultados com diferença de expressão de 2 vezes, tanto para ganho quanto para perda de expressão, foram considerados positivos. A tabela 5.4 mostra os resultados para a linhagem SCC-9 e evidencia que apenas dois genes apresentaram aumento de expressão (HOXD12 e PROX1) e dois apresentaram baixa de expressão (MSX2 e MEOX1) após o tratamento com ácido retinóico. A diferença de expressão, desvio padrão e valor de p para esses quatro genes são descritos na tabela 5.5.

Tabela 5.4 – Resultados da indução da expressão gênica promovida pelo ácido retinóico na linhagem SCC-9. AR= Ácido retinóico; --- = sem diferença; ↑ = aumento de expressão; ↓ = baixa de expressão

<i>Gene</i>	<i>AR</i>	<i>Gene</i>	<i>AR</i>	<i>Gene</i>	<i>AR</i>
ALX1	---	HOXB4	---	MIXL1	---
ALX4	---	HOXB7	---	MKX	---
ARX	---	HOXB8	---	MSX1	---
BARX1	---	HOXB9	---	MSX2	↓
CDX1	---	HOXC10	---	NKX3-1	---
CDX2	---	HOXC11	---	OTP	---
CUX1	---	HOXC12	---	OTX1	---
DLX1	---	HOXC13	---	OTX2	---
DLX2	---	HOXC6	---	PAX3	---
DLX3	---	HOXC8	---	PDHX	---
DLX4	---	HOXC9	---	PHOX2B	---
DLX5	---	HOXD1	---	PITX1	---
DLX6	---	HOXD11	---	PITX2	---
DMBX1	---	HOXD12	↑	PITX3	---
DRGX	---	HOXD13	---	POU5F1	---
EMX1	---	HOXD3	---	PROP1	---
EN1	---	HOXD4	---	PROX1	↑
EN2	---	HOXD8	---	SHOX	---
HESX1	---	HOXD9	---	SHOX2	---
HHEX	---	ISL1	---	SIX1	---
HLX	---	ISL2	---	SIX2	---
HOPX	---	LBX1	---	SIX3	---
HOXA1	---	LBX2	---	SIX4	---
HOXA7	---	LHX1	---	SIX6	---
HOXA9	---	LMX1A	---	TLX1	---
HOXB1	---	LMX1B	---	VAX1	---
HOXB2	---	MEIS1	---	VAX2	---
HOXB3	---	MEOX1	↓	VSX1	---

Tabela 5.5 –Tabela com valores de diferença de expressão, desvio padrão e de P para os quatro genes diferencialmente expressos entre linhagem SCC-9 tratada com ácido retinóico e etanol

Gene	Diferença de expressão	Desvio padrão	Valor de P
HOXD12	3.07	0.23	0.0883
MEOX1	-6.15	0.16	0.0427
MSX2	-2.97	0.34	0.0542
PROX1	2.89	1.05	0.0617

Considerando que a linhagem SCC-9 não apresentou diferença de crescimento durante o tratamento com ácido retinóico, era de se esperar um pequeno número de genes com diferença de expressão entre células controle e tratadas e é possível que esses genes estejam ligados a outros mecanismos celulares, mas não com o tratamento com ácido retinóico.

5.2.4 SCC-25

Da mesma forma como foi realizado para a SCC-9, os valores de Ct obtidos com a linhagem SCC-25 foram avaliados para verificar quais genes não estão expressos e quais estão altamente expressos. Dos 84 genes estudados, uma média de 16 genes apresentaram Ct abaixo de 25 no grupo etanol e 16 no grupo do ácido retinóico. Para valores de Ct entre 25 e 35, foram identificados 55 genes do grupo etanol e 54 do ácido retinóico. Para Ct superior a 35, 13 genes foram identificados no grupo etanol e 14 no grupo ácido retinóico (Figura 5.7).

Figura 5.7 – Gráfico exibindo as variações dos valores de Ct para 84 genes homeobox no PCR array da linhagem celular SCC-25

A avaliação dos valores de Ct comparando os resultados dos grupos etanol e ácido retinóico identificou treze genes com baixa expressão na linhagem SCC-25 e também treze que estavam altamente expressos (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Tabela com os genes que não estão expressos e genes que estão altamente expressos na linhagem celular SCC-25

<i>Genes com baixa expressão na SCC-25</i>		<i>Genes com alta expressão na SCC-25</i>	
ARX	OTX2	CUX1	MSX2
CDX1	PHOX2B	DLX2	PDHX
DLX5	PITX3	DLX4	PITX1
DRGX	PROP1	HOXB7	PITX2
HOXB1	SHOX	HOXC10	SIX1
LBX1	VSX1	HOXC13	SIX4
LMX1A		HOXD11	

A análise por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos resultados obtidos para a linhagem SCC-25 foi realizada para verificar os genes diferencialmente expressos na linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca responsiva a ácido retinóico. De acordo com os

resultados, dos 84 genes avaliados, nove apresentaram perda de expressão superior a 2 vezes sob o estímulo do ácido retinóico, enquanto apenas quatro genes estavam superexpressos. O resultado geral pode ser observado na tabela 5.7. A tabela 5.8 mostra os valores da diferença de expressão, desvio padrão e valor de p para os genes diferencialmente expressos.

Tabela 5.7 – Tabela com o resultado dos genes diferencialmente expressos com ácido retinóico na linhagem SCC-25. AR= Ácido retinóico; --- = sem diferença; ↑ = aumento de expressão; ↓ = baixa de expressão

<i>Gene I</i>	<i>AR</i>	<i>Gene</i>	<i>AR</i>	<i>Gene</i>	<i>AR</i>
ALX1	↓	HOXB4	---	MIXL1	---
ALX4	↓	HOXB7	---	MKX	---
ARX	---	HOXB8	---	MSX1	---
BARX1	---	HOXB9	---	MSX2	---
CDX1	---	HOXC10	---	NKX3-1	---
CDX2	---	HOXC11	---	OTP	---
CUX1	---	HOXC12	---	OTX1	---
DLX1	---	HOXC13	---	OTX2	---
DLX2	---	HOXC6	---	PAX3	---
DLX3	↓	HOXC8	---	PDHX	---
DLX4	---	HOXC9	---	PHOX2B	---
DLX5	---	HOXD1	↑	PITX1	---
DLX6	↓	HOXD11	---	PITX2	---
DMBX1	---	HOXD12	---	PITX3	---
DRGX	---	HOXD13	---	POU5F1	---
EMX1	---	HOXD3	---	PROP1	---
EN1	---	HOXD4	---	PROX1	---
EN2	↑	HOXD8	---	SHOX	---
HESX1	---	HOXD9	---	SHOX2	---

HHEX	---	ISL1	---	SIX1	---
HLX	↓	ISL2	---	SIX2	---
HOPX	↓	LBX1	---	SIX3	↓
HOXA1	---	LBX2	---	SIX4	---
HOXA7	---	LHX1	---	SIX6	---
HOXA9	---	LMX1A	---	TLX1	↓
HOXB1	---	LMX1B	---	VAX1	↑
HOXB2	---	MEIS1	---	VAX2	---
HOXB3	↑	MEOX1	↓	VSX1	---

Tabela 5.8 – Tabela com valores de diferença de expressão, desvio padrão e valor de P para os treze genes diferencialmente expressos na linhagem SCC-25 sob estímulo do ácido retinóico

<i>Gene</i>	<i>Diferença de expressão</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de P</i>
ALX1	-7.66	0.10	0.0205
ALX4	-2.12	0.33	0.0583
DLX3	-2.44	0.08	0.0009
DLX6	-2.48	0.06	0.0264
EN2	2.22	0.67	0.0031
HLX	-2.25	0.07	0.0020
HOPX	-2.28	0.29	0.0249
HOXB3	2.07	1.70	0.1504
HOXD1	2.72	0.41	0.0002
MEOX1	-3.06	0.11	0.0294
SIX3	-2.23	0.39	0.0821
TLX1	-2.38	0.48	0.2075
VAX1	3.97	0.75	0.1081

5.3 Validação dos resultados por qPCR

Baseado nos resultados do PCR array, genes que apresentaram perda de expressão superior a duas vezes na linhagem SCC-25 e não apresentaram alteração significativa na linhagem SCC-9, foram selecionados para a validação por qPCR utilizando-se amostras também tratadas com ácido retinóico por sete dias. Um total de sete genes foi avaliado nessa fase do estudo e foram eles ALX1, DLX3, DLX6, HLX, HOPX, SIX3 e TLX1.

5.3.1 SCC-9

Os resultados obtidos para a célula SCC-9 estão representados na figura 5.8. Como pode ser observado, nenhum dos genes apresentou diferença de expressão superior a dois. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado no PCR array, onde esses genes não apresentaram alteração de expressão significativa com o ácido retinóico.

Figura 5.8 – Gráfico com valores de diferença expressão para cada gene avaliado durante a validação por qPCR na amostras SCC-9. * = valor de $P < 0.05$; ** = valor de $P < 0.03$

5.3.2 SCC-25

Os resultados de diferença de expressão obtidos para a célula SCC-25 durante a etapa de validação podem ser observados na figura 5.9. Todos os genes avaliados apresentaram baixa de expressão e os valores obtidos são semelhantes aos encontrados na análise por PCR array. A análise estatística mostrou que a diferença de expressão foi estatisticamente significativa para seis genes (ALX1, DLX3, HLX, HOPX, SIX3 e TLX1), sendo que o único que não apresentou essa correlação foi os DLX6. Este experimento confirmou que esses genes apresentam perda de expressão na durante a inibição de crescimento celular promovida pelo ácido retinóico na linhagem SCC-25.

Figura 5.9 – Gráfico com os valores de diferença expressão para cada gene avaliado durante a validação por qPCR na amostras SCC-25. * = valor de $P < 0.05$, ** = valor de $P < 0.02$

5.4 Análise da expressão através do tempo

Com o objetivo de verificar o padrão de baixa de expressão de genes que tiveram seus resultados confirmados após a validação, genes que apresentaram baixa de expressão superior a três foram submetidos ao estudo de nível de expressão por qPCR em amostras da linhagem SCC-25 tratadas por 3, 5 e 7 dias. Os genes selecionados para essa avaliação foram ALX1, DLX3 e TLX1.

Os resultados mostraram que o ALX1 apresenta baixa de expressão apenas no dia 7, que foi estatisticamente significativa comparada aos dias 3 e 5. A baixa de expressão do DLX3 pode ser observada já no dia 3, com valor semelhante no dia 5 e intensificada no dia 7. Para o TLX1, a baixa de expressão não foi significativa no dia 3, apenas nos dias 5 e 7, quando apresentaram valores semelhantes (Figura 5.10).

Figura 5.10 –Gráfico com os valores de diferença de expressão dos três genes cuja expressão foi avaliada através do tempo para amostras SCC-25. * = valor de $P < 0.03$ and ** = valor de $P < 0.01$ para cada dia do estudo; — = P value < 0.05 and - - - = P value < 0.03 para análise entre os diversos dias do estudo

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avalia, pela primeira vez, a expressão de genes homeobox, em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca sob o estímulo por ácido retinóico. Os resultados indicaram que, dos 84 genes homeobox avaliados, treze foram diferencialmente expressos após o tratamento com ácido. Dentre eles, nove apresentaram perda de expressão e quatro, ganho de expressão. Uma análise mais detalhada da expressão de três desses genes (ALX1, DLX3, TLX1) com células tratadas por diferentes períodos de tempo com ácido retinóico sugeriu que a perda de expressão desses genes ocorre de maneira indireta em resposta ao tratamento com o ácido retinóico.

6.1 Efeito do ácido retinóico em linhagens de carcinoma epidermóide de boca

Já foi demonstrado que o ácido retinóico é capaz de inibir o crescimento celular nas linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca SCC-9, SCC-15, SCC-25 e KB. Alguns estudos mostraram que essa inibição do crescimento é, na maior parte, relacionada à parada do ciclo celular na fase G1, não envolvendo apoptose, e é acompanhada por aumento da citoqueratina 13 e da atividade de fosfatase alcalina, indicando que a célula passa pelo processo de diferenciação celular (KURODA et al., 2005; XIAO et al., 2006; YANG et al., 2001, ZHAO et al., 2009). No presente trabalho, a linhagem SCC-25 apresentou uma taxa de inibição

de crescimento de 42,11% e SCC-9 de -0,78% após sete dias de tratamento com ácido retinóico. Os resultados encontrados para a SCC-25 estão de acordo com os observados na literatura, no entanto os da SCC-9 não, já que a literatura relata uma inibição de crescimento em torno de 45% para essa linhagem e este trabalho não verificou inibição (YANG et al., 2001). Os diferentes resultados observados para a linhagem SCC-9 podem ser causados por mudanças ocorridas durante as passagens sofridas pela linhagem e não comprometem os resultados do presente estudo, já que, em todos os momentos, o crescimento celular foi avaliado através de contagem celular e a SCC-9 manteve-se não responsiva ao ácido retinóico, e foi utilizada justamente por esse motivo.

6.2 Perfil dos genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca

Os genes homeobox foram considerados como baixa ou alta expressão, nas linhagens de carcinoma epidermóide de boca após análise dos valores de Ct obtidos durante o PCR array, desconsiderando-se o tratamento da célula com ácido retinóico. De acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante das placas de PCR array (SABiosciences; Frederick, MD, USA), genes que apresentam valores de Ct acima de 35 ciclos são considerados como de baixa expressão. Já genes com valores de Ct abaixo de 25, altamente expressos.

Seguindo o padrão de análise proposto pelo fabricante, verificou-se que a linhagem celular SCC-9 apresentou 24 genes com baixa e nove com alta expressão. Para a linhagem SCC-25 foram observados treze genes em cada grupo. A diferença

entre os genes encontrados para cada linhagem celular pode ser explicada pelo fato dessas células serem isoladas de pacientes diferentes e apresentarem comportamentos biológicos distintos, refletindo diferenças dos tumores das quais eles foram isoladas (RHEINWALD; BECKETT, 1981). Os resultados obtidos para cada linhagem, quando comparados, mostraram que treze genes tiveram baixa expressão nas duas linhagens (ARX, CDX1, DLX5, DRGX, HOXB1, LBX1, LMX1A, OTX2, PHOX2B, PROP1, SHOX, VSX1) e setes, alta expressão (CUX1, HOXB7, HOXC10, PDHX, PITX1, PITX2, SIX4). Novos estudos são necessários para verificar se esses achados se comprovam em outras linhagens celulares e em amostras de tumores.

Entre os genes de baixa expressão, o único que foi previamente estudado em carcinoma epidermóide de boca é o HOXB1, que apresentou resultado semelhante ao já descrito na literatura. O HOXB7 e o HOXC10, que apresentaram alta expressão, também já foram descritos em carcinoma epidermóide de boca. O HOXB7 apresentou resultados semelhantes aos anteriores, onde se observou que ele está mais expresso em carcinoma, quando comparado a displasia e mucosa oral normal. Os resultados anteriores do HOXC10 não indicaram diferenças entre mucosa normal, displasia e carcinoma epidermóide de boca (HASSAN et al., 2006), o que difere do nosso estudo, porém esse resultado pode ser devido ao modelo escolhido ser “in vitro”.

6.3 Genes homeobox diferencialmente expressos em carcinoma epidermóide de boca sob estímulo por ácido retinóico

Nas análises de quantificação relativa através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram considerados como genes diferencialmente expressos, aqueles que apresentaram valores de diferença de expressão superiores a dois, tanto para ganho quanto perda de expressão, comparando-se as amostras tratadas com ácido retinóico e o controle etanol.

A linhagem SCC-9 apresentou quatro genes dentro desse critério, sendo que dois estavam com aumento de expressão (PROX1 e HOXD12) e dois com baixa de expressão (MEOX1 e MSX2). Considerando-se que essa linhagem celular não apresentou diminuição do seu crescimento com o tratamento por ácido retinóico, é possível que esses genes estejam relacionados a outros processos celulares, como crescimento e adesão celular, mas não a parada do ciclo celular e inibição do crescimento celular promovida pelo ácido retinóico. De fato, a expressão de MSX2 e PROX1 já foram descritas durante a carcinogênese. Linhagens celulares de carcinoma de mama de camundongo superexpressando MSX2 apresentam diminuição do componente de adesão celular E-caderina, aumento da vimentina e N-caderina e aumento da capacidade de invasão (DI BARI et al., 2009). Demonstrou-se que a superexpressão de PROX1 contribui para a progressão tumoral através da supressão da adesão celular e regulação do citoesqueleto em cancer colorectal (PETROVA et al., 2008).

A linhagem SCC-25 apresentou nove genes com perda e quatro com ganho de expressão após o tratamento da célula com ácido retinóico. Genes homeobox, em especial os da família HOX, já foram descritos com tendo sua expressão influenciada pelo ácido retinóico durante o desenvolvimento. Essa influência exercida do ácido levou a pesquisas com o objetivo de identificar elementos

responsivos a ácido retinóico (RARE) na região promotora dos homeobox e, até agora, cinco genes já tiveram RAREs descritos (HOXA1, HOXB1, HOXD4, CDX1, MSX1) (HOULE; SYLVESTRE; LOHNES, 2003; LANGSTON; GUDAS, 1992; MORONI; VIGANÓ; MAVILIO, 1993; OGURA; EVANS, 1995; SHEN et al., 1994). Por essa razão, era esperado que fosse identificado um grande número de genes modulados pela administração do ácido retinóico em carcinoma epidermóide e, em especial, os genes que possuem RARE descritos. Os resultados obtidos com esse estudo, no entanto, mostraram que dos 84 genes avaliados, apenas treze apresentaram expressão modulada pelo ácido retinóico, sendo que nenhum deles apresenta RAREs já descritos.

Outro achado interessante desse estudo é que a maioria dos genes teve perda de expressão ao invés de ganho. Esse resultado pode estar relacionado com o perfil de expressão dos genes homeobox durante a carcinogênese. Os genes homeobox são conhecidos por serem grandes reguladores do desenvolvimento e que, durante a carcinogênese, apresentam três padrões de expressão. Nos dois primeiros, os homeobox apresentam ganho de expressão quando comparados ao tecido que deu origem a neoplasia, no entanto em um deles o gene está expresso no tecido embrionário correspondente e no outro não. No terceiro padrão, há perda de expressão gênica no tumor quando comparado ao tecido de origem (ABATE-SHEN, 2002). Dentro desse aspecto, é possível que o ganho ou perda de expressão após o tratamento com ácido retinóico seja um retorno ao padrão de expressão desses genes em tecidos diferenciados no epitélio da cavidade bucal, já que o ácido retinóico promove diferenciação das células do carcinoma epidermóide. Estudos que avaliem os níveis de expressão desses genes em mucosa normal, displasias e

carcinomas epidermóides menos e mais agressivos podem dar melhores respostas a esta hipótese.

Um aspecto que merece atenção é que dentre os treze genes diferencialmente expressos, dez apresentaram valores de diferença de expressão ao redor de dois, não superior a três. Se os genes homeobox fossem importantes no mecanismo de ação do ácido retinóico em carcinoma epidermóide de boca, era de se esperar uma maior porcentagem de genes com diferença de expressão e com valores de diferença de expressão altos, como observados para o ALX1 e para o VAX1. Esses dados sugerem que os homeobox podem não ser os alvos primários do ácido retinóico no carcinoma epidermóide de boca, mas sim terem a sua expressão modulada de forma indireta pelo ácido. De fato, já foi demonstrado que expressão dos homeobox induzida pelo ácido retinóico pode ser modulada por outras vias de sinalização celulares. O tratamento de células da crista neural com ácido retinóico, por exemplo, induz a expressão de HOXA2, mas a adição de BIO, um inibidor de GSK-3 que ativa a via canônica do WNT, nesse sistema leva a uma redução do HOXA2, o que indica que a expressão do homeobox pelo ácido foi ativada não de forma direta, mas sim, por outros mecanismos celulares (ISHIKAWA; ITO; 2009). Mecanismos como esse podem ser considerados para o carcinoma epidermóide de boca, já que diversas vias de sinalização celular podem estar alteradas, podendo elas interferir na sinalização do ácido retinóico e na expressão dos homeobox.

É interessante que o MEOX1, que participa do desenvolvimento dos somitos, foi descrito em tumores de Wilm e que se acredita estar envolvido na transição epitélio-mesênquima, foi o único gene que apresentou baixa de expressão nas linhagens SCC-9 e SCC-25, com valores de diferença de expressão de -6.15 e

-3.06, respectivamente (BARD; LAM; AITKEN, 2008; LI et al, 2002). Já que a linhagem SCC-9 não apresenta inibição de crescimento pelo ácido retinóico, a perda de expressão do MEOX1 observada pode relacionada a algum outro mecanismo celular. Esse gene já teve a sua expressão relacionada a reorganização do citoesqueleto. Issaeva et al. (2007) demonstraram que a baixa de expressão do MEOX1 promovida por nocaute do gene ALR (MLL2) em linhagem celular de câncer cervical é seguida por uma organização do citoesqueleto e declínio no processo de tumorigênese da célula.

O método de PCR array é baseado no uso de qPCR com o objetivo de avaliar genes diferencialmente expressos em uma determinada condição e de forma mais confiável que utilizando-se o microarray. Já que a qPCR é utilizada nesse método, alguns poderiam dizer que não há necessidade de validação dos resultados obtidos, no entanto optou-se pela validação para confirmar que essa metodologia é confiável e os resultados obtidos, válidos. Considerando-se que um grande número de genes apresentou perda de expressão, acredita-se que esse seja um importante mecanismo na ação do ácido retinóico sobre os genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca e por isso, foi realizada a validação desses genes. Dos nove genes nessa categoria, selecionamos os genes com os maiores valores de baixa de expressão, sem levar em consideração o desvio padrão e o valor de p obtidos durante o PCR array. O MEOX1, que também apresentou perda de expressão na SCC-9, foi excluído dessa avaliação e sete genes foram selecionados (ALX1, DLX3, DLX6, HLX, HOPX, SIX3 e TLX1). Os resultados confirmaram que nenhum desses genes apresentou valores de diferença de expressão superiores a dois na linhagem não responsiva ao ácido. Na linhagem responsiva, todos mostraram perda de expressão com valores superiores a dois. Também foram identificados três genes

com diferença de expressão superior a três (ALX1, DLX3 e TLX1), enquanto durante o PCR array, apenas o ALX1 havia sido identificado.

6.4 Análise de expressão através do tempo

Genes que apresentaram diminuição de expressão com valores superiores a três foram submetidos a análise de expressão através do tempo. Para isso, os níveis de expressão dos genes ALX1, DLX3 e TLX1 foram analisados em amostras da linhagem SCC-25 tratadas com ácido retinóico pelos períodos de 3, 5 e 7 dias.

6.4.1 ALX1

O ALX1, também chamado de CART1, foi inicialmente isolado em linhagem celular proveniente de condrossarcoma de camundongo (ZHAO et al., 1993). Durante o desenvolvimento embrionário de camundongo, ele está expresso apenas em células mesenquimais precursoras de cartilagem da região da cabeça (ZHAO et al., 1994). Em 1996, Gordon et al., com o objetivo de avaliar a estrutura e a localização cromossômica desse gene em humanos, verificaram que ele é semelhante aos gene da família paired dos homebox e está localizado no cromossomo 12, na região 12q21.3-q22. Eles também conseguiram isolar o cDNA desse gene a partir da linhagem celular de adenocarcinoma cervical, HeLa, e

verificaram a expressão dele em amostras de tecido cervical normal, indicando que a expressão desse gene não se encontra restrita a tecidos cartilaginosos. O ALX1 atua em cooperação com o ALX4, gene com qual possui grande homologia, na condensação mesenquimal que dará origem a ossos, principalmente da região craniofacial (QU et al., 1999). De forma interessante, este trabalho verificou através do PCR array que o ALX4 também possui perda de expressão com o ácido retinóico, no entanto, não tão intensa quanto a do ALX1. Esse dado sugere que esses dois genes podem cooperar durante a carcinogênese de boca e ação do ácido retinóico.

Um fator relevante dos achados do presente trabalho é que essa é a primeira vez que o ALX1 é descrito em carcinoma epidermóide de boca. Considerando que esse gene tem sua expressão intimamente ligada a tecidos mesenquimais, levanta-se a hipótese de que o carcinoma epidermóide poderia ter um ganho da expressão desse gene durante a carcinogênese e que o tratamento da célula com ácido retinóico, levaria a uma drástica redução dos níveis desse gene na célula. Trabalhos que verifiquem a presença do ALX1 em epitélio bucal e em carcinoma epidermóide são necessários para comprovar essa hipótese. E caso o ALX1 não esteja presente em epitélio bucal, mas apenas em carcinoma, ele poderia ser útil como um marcador de progressão tumoral.

A análise da expressão através do tempo do ALX1 demonstrou que ele não apresentou diferença de expressão significativa nos dias 3 e 5, no entanto no dia 7 a diferença de expressão foi de -9.07 ($p=0.0036$). Esse dado mostra que a perda de expressão do ALX1 ocorre tardiamente após a indução das células por ácido retinóico e isso sugere que o efeito do ácido sobre a expressão do ALX1 é mediado por outros fatores.

6.4.2 DLX3

DLX3 (distal-less homeobox 3) é um gene homeobox da família distal-less que está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21). Essa família de genes se originou a partir de uma série de duplicações do gene distal-less (Dll) da *Drosophila* onde, durante o desenvolvimento embrionário, ele é necessário para o correto desenvolvimento dos membros. Em humanos, seis genes distal-less já foram descritos. Eles encontram-se agrupados aos pares e distribuídos nos cromossomos 2 (DLX1 e DLX2), 17 (DLX3 e DLX4) e 7 (DLX5 e DLX6) (MERLO et al., 2000). O papel do DLX3 em humanos está relacionado à osteogênese e desenvolvimento craniofacial, e a sua expressão já foi descrita em placenta, epiderme, dente e folículo piloso. A importância desse gene para o desenvolvimento da epiderme e apêndices embrionários levou os pesquisadores a sugerirem que ele esteja envolvido na patogênese de displasias ectodérmicas. De fato, mutações no gene DLX3 têm sido associadas à síndrome trico-dento-óssea (HASSAN et al., 2004; MORASSO et al., 1999; MORASSO; MAHON; SARGENT, 1995; PRICE et al., 1998).

A relação entre a expressão de DLX3 e o tratamento por ácido retinóico só foi estabelecida por um trabalho. Shimizu et al. (2007) avaliaram o padrão de expressão gênica da formação dos membros durante o desenvolvimento embrionário, após a exposição da mãe a doses teratogênicas de ácido retinóico. Os autores observaram que, seis horas após a administração do ácido, o DLX3 teve a sua expressão reduzida na saliência epitelial responsável pelo crescimento os membros, e que essa redução foi acompanhada pela não formação de dedos.

Um dos principais papéis desempenhados pelo DLX3 é a regulação do p63, que é uma proteína que possui grande homologia ao p73 e ao supressor de tumor p53 e desempenha importante papel no desenvolvimento e manutenção do epitélio estratificado. Existem seis isoformas do p63 descritas, que são resultados da presença (TA) ou ausência (Δ N) do domínio N terminal e do “splicing” alternativo da região C terminal (α , β , γ). Já foi demonstrado que as isoformas TAp63 α and TAp63 γ são capazes de ativar ou reprimir, respectivamente, a transcrição do DLX3. Curiosamente, o DLX3 induz a fosforilação da proteína Raf1, que promove a ubiquitinação e degradação da isoforma Δ Np63 α (DI COSTANZO et al., 2009; MORETTI; COSTANZO et al., 2009; RADOJA et al., 2007) A figura 6.1 ilustra os mecanismos nos quais o DLX3 está envolvido.

Figura 6.1 – Esquema com os mecanismos celulares relacionados ao gene DLX3

A interação do DLX3 com as diferentes isoformas do p63 pode ter importante papel na patogênese do carcinoma epidermóide de boca. Trabalhos da literatura

mostram que as isoformas possuem diferentes funções durante a maturação do epitélio estratificado, sendo que as isoformas $\Delta Np63$ são importantes na manutenção do potencial proliferativo das células da camada basal, enquanto as isoformas TAp63 estão ligadas a diferenciação celular (CANDI et al., 2008). Curiosamente, a isoforma $\Delta Np63\alpha$, que tem a sua expressão regulada pelo DLX3, é a mais abundante em carcinoma epidermóide de boca e a sua perda está ligada ao aumento de invasividade do tumor (HIGASHIKAWA et al., 2007). Considerando que a diferenciação celular ligada ao ácido retinóico é acompanhada por diminuição do DLX3, sugere-se que a perda da expressão desse gene diminua a degradação e leve ao acúmulo da isoforma $\Delta Np63$ na célula, o que poderia reduzir a capacidade de invasão e agressividade do tumor.

Os valores de diferença de expressão do DLX3 para a análise de expressão através do tempo mostrou que o DLX3 tem perda de sua expressão desde o dia 3 (-2.59; $p=0.0247$), apresentando valor semelhante do dia 5 (-2.23; $p=0.0945$) e uma intensificação do dia 7 (4.24; $p=0.0055$). O fato do padrão de perda de expressão para esse gene ter sido mais regular do que para o ALX1, sugere que uma análise mais detalhada do padrão de perda de expressão, incluindo períodos mais curto, deve ser realizada para verificar se esse gene pode ter a sua expressão diretamente regulada pelo ácido retinóico.

6.4.3 TLX1

O gene TLX1 (HOX11) é um homeobox cuja expressão já foi descrita em embrião de camundongo em órgãos e tecidos derivados dos três folhetos embrionários, porém a sua participação na carcinogênese ainda é incerta. Ele foi inicialmente descrito com um proto-oncogene em leucemia linfoblástica aguda, onde a translocação no cromossomo 10 leva a superexpressão de TLX1 (HATANO et al., 1991). Observou-se que a metilação levando ao silenciamento do gene TLX1 é um evento inicial no desenvolvimento do câncer de mama, e que pode contribuir na patogênese dessa neoplasia (TOMMASI et al., 2009). Os nossos dados mostraram que o TLX1 apresenta acentuada perda de expressão no dia 5 (-3,01; $p=0.0031$) e 7 (-2.82; $p=0.0209$), mas não no dia 3 (-1.13; $p=0.1620$). Esse resultado sugere que a perda de expressão do TLX1 ocorra a partir do dia 5 e se mantenha em níveis constantes. Considerando que essa perda ocorre mais tardiamente, é provável que essa perda de expressão seja mediada por outros mecanismos celulares ou resultado da mudança do comportamento celular.

A análise através do tempo sugere que a modulação da expressão desses três genes pelo ácido retinóico ocorra de forma indireta, já que os valores de diferença de expressão no dia três não indicaram uma perda de expressão intensa. Porém, o DLX3, que apresentou perda de expressão no dia 3, deveria ter a sua expressão avaliada em períodos de tempo mais curtos, a fim de verificar se ele é diretamente controlado pelo ácido retinóico. Embora o presente trabalho não aponte nenhum homeobox que tenha expressão diretamente modulada pelo ácido retinóico, ele identificou genes que podem ter a sua expressão influenciada indiretamente, e ainda assim exercerem um papel na patogênese do carcinoma epidermóide de boca.

7 CONCLUSÕES

- O tratamento das linhagens celulares SCC-9 e SCC-25 com ácido retinóico promove a inibição do crescimento apenas da linhagem SCC-25.
- Genes homeobox são responsivos ao ácido retinóico em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca, sendo que oito genes apresentam perda de expressão (ALX1, ALX4, DLX3, DLX6, HLX, HOPX, MEO1, SIX3, TLX1) e quatro genes apresentam ganho de expressão (EN2, HOXB3, HOXD1, VAX1).
- Na análise através do tempo o padrão da perda de expressão para os genes ALX1, DLX3 e TLX1 sugere que a atuação do ácido retinóico sobre eles é indireta e mediada por outros mecanismos celulares.

REFERÊNCIAS¹

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

Baek SH, Kiousi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, et al. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3245-50.

Bard JB, Lam MS, Aitken S. A bioinformatics approach for identifying candidate transcriptional regulators of mesenchyme-to-epithelium transitions in mouse embryos. *Dev Dyn*. 2008 Oct;237(10):2748-54.

Benner SE, Pajak TF, Lippman SM, Earley C, Hong WK. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: long-term follow-up. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(2):140-1.

Buletic Z, Soprano KJ, Soprano DR. Retinoid targets for the treatment of cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16(3):193-210.

Campo Dell'Orto M, Banelli B, Giarin E, Accordi B, Trentin L, Romani M, et al. Down-regulation of DLX3 expression in MLL-AF4 childhood lymphoblastic leukemias is mediated by promoter region hypermethylation. *Oncol Rep* 2007;18(2):417-23.

Candi E, Cipollone R, Rivetti di Val Cervo P, Gonfloni S, Melino G, Knight R. p63 in epithelial development. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3126-33.

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

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 2005;114(5):806-16.

Charboneau A, East L, Mulholland N, Rohde M, Boudreau N. Pbx1 is required for Hox D3-mediated angiogenesis. *Angiogenesis* 2005;8(4):289-96.

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

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

Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4085-95.

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

Cuperlovic-Culf M, Belacel N, Ouellette RJ. Determination of tumour marker genes from gene expression data. *Drug Discov Today* 2005;10(6):429-37.

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

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

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

di Bari MG, Ginsburg E, Plant J, Strizzi L, Salomon DS, Vonderhaar BK. Msx2 induces epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells through upregulation of Cripto-1. *J Cell Physiol* 2009;219(3):659-66.

Di Costanzo A, Festa L, Duverger O, Vivo M, Guerrini L, La Mantia G, et al. Homeodomain protein Dlx3 induces phosphorylation-dependent p63 degradation. *Cell Cycle* 2009;8(8):1185-95.

Dimberg A, Bahram F, Karlberg I, Larsson LG, Nilsson K, Oberg F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). *Blood* 2002;99(6):2199-206.

Ee HC, Erler T, Bhathal PS, Young GP, James RJ. Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am J Pathol* 1995; (147):586-92.

Fernandez CC, Gudas LJ. The truncated Hoxa1 protein interacts with Hoxa1 and Pbx1 in stem cells. *J Cell Biochem* 2009;106(3):427-43.

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

Freemantle SJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E. The retinoic acid paradox in cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(7):426-7.

Freemantle SJ, Vaseva AV, Ewings KE, Bee T, Krizan KA, Kelley MR, et al. Repression of cyclin D1 as a target for germ cell tumors. *Int J Oncol* 2007;30(2):333-40.

Gordon DF, Wagner J, Atkinson BL, Chiono M, Berry R, Sikela J, et al. Human Cart-1: structural organization, chromosomal localization, and functional analysis of a cartilage-specific homeodomain cDNA. *DNA Cell Biol* 1996;15(7):531-41.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated level of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53(13):3579-84.

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

Gudas LJ. Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth Differ* 1992;3(9):655-62.

Guntinas-Lichius O, Wendt T, Buentzel J, Esser D, Lochner P, Mueller A, et al. Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Jul 1. [Epub ahead of print]

Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, et al. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):9248-61

Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res* 2006;16(5):217-24.

Hatano M, Roberts CW, Minden M, Crist WM, Korsmeyer SJ. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science* 1991;253(5015):79-82.

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

Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Taki M, Shigeishi H, Kamata N. Snail-induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2007; 1;67(19):9207-13.

Hoegg S, Meyer A. Hox clusters for vertebrate genome evolution. *Trends Genet* 2005;21(8) 421-4.

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

Hong WK, Endicott J, Itri LM, Doos W, Batsakis JG, Bell R, et al. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *N Engl J Med* 1986 Dec 11;315(24):1501-5.

Houle M, Sylvestre JR, Lohnes D. Retinoic acid regulates a subset of Cdx1 function in vivo. *Development* 2003;130(26):6555-67.

Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, Gudas LJ. Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991;51(15):3972-81.

Hu G, Lee H, Price SM, Shen MM, Abate-Shen C. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development* 2001;128(12):2373-84.

Ishikawa S, Ito K. Plasticity and regulatory mechanisms of Hox gene expression in mouse neural crest cells. *Cell Tissue Res* 2009;337(3):381-91.

Issaeva I, Zonis Y, Rozovskaia T, Orlovsky K, Croce CM, Nakamura T, et al. Knockdown of ALR (MLL2) Reveals ALR Target Genes and Leads to Alterations in Cell Adhesion and Growth. *Mol Cell Biol* 2007;27(5):1889-903.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225-49.

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

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 2007;315(5813):820-5.

Khuri FR, Lee JJ, Lippman SM, Kim ES, Cooper JS, Benner SE, et al. Randomized phase III trial of low-dose isotretinoin for prevention of second primary tumors in stage I and II head and neck cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(7):441-50.

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

Kuper H, Adami HO, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J Intern Med* 2002;251(6):455–66.

Kuroda J, Urade M, Kishimoto H, Noguchi K, Hashitani S, Sakurai K, et al. Promotion of cell differentiation, and suppression of cell growth and cyclooxygenase-2 expression by differentiation-inducing agents in human oral squamous carcinoma SCC25 cells. *Int J Oncol* 2005;26(2):361-7.

Langston AW, Gudas LJ. Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech Dev* 1992;38(3):217-27.

Langston AW, Gudas LJ. Retinoic acid and homeobox gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(4):550-5.

Li CM, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, et al. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 2002 Jun;160(6):2181-90.

Lippman SM, Batsakis JG, Toth BB, Weber RS, Lee JJ, Martin JW et al. Comparison of low-dose isotretinoin with beta carotene to prevent oral carcinogenesis. *N Engl J Med* 1993;328(1):15-20.

Liu X, Jiang L, Wang A, Yu J, Shi F, Zhou X. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2009 [Epub ahead of print].

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

Ma I, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449:682-8.

Mark M, Rijli FM, Chambom P. Homeobox genes in Embryogenesis and Pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42(4):421-9.

Merlo GR, Zerega B, Paleari L, Trombino S, Mantero S, Levi G. Multiple functions of Dlx genes. *Int J Dev Biol* 2000;44(6):619-26.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA;2007. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> [2009 ago.13]

Ministério da Saúde. Instituto nacional do câncer. Falando sobre o câncer de boca. 2002. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/falandosobrecancerdeboca.pdf> [2009 ago. 13].

Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 2007; 75(9):853-70

Morasso MI, Grinberg A, Robinson G, Sargent TD, Mahon KA. Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. *Proc Natl Acad Sci US*. 1999;96(1):162-7.

Morasso MI, Mahon KA, Sargent TD. A *Xenopus* distal-less gene in transgenic mice: conserved regulation in distal limb epidermis and other sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(9):3968-72.

Moretti F, Costanzo A. A feedback regulatory loop between p63 and Dlx3: implications for epidermal differentiation. *Cell Cycle*.2009;8(8):1113.

Moroni MC, Viganó MA, Mavilio F. Regulation of the human HOXD4 gene by retinoids. *Mech Dev* 1993;44(2-3):139-54.

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

Niles RM. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 2004;555(1-2):81-96.

Ogura T, Evans RM. A retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(2):387-91.

Petrova TV, Nykänen A, Norrmén C, Ivanov KI, Andersson LC, Haglund C, et al. Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell*. 2008;13(5):407-19.

Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet*. 1998;7(3):563-9.

Primer Bank. PCR Primers of genes expression detection and quantification. Disponível em: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html> [2009 mar.24]

Qu S, Tucker SC, Zhao Q, deCrombrugghe B, Wisdom R. Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1. *Development* 1999;126(2):359-69.

Radoja N, Guerrini L, Lo Iacono N, Merlo GR, Costanzo A, Weinberg WC, et al. Homeobox gene Dlx3 is regulated by p63 during ectoderm development: relevance in the pathogenesis of ectodermal dysplasias. *Development* 2007;134(1):13-8.

Ralhan R, Chakravarti N, Kaur J, Sharma C, Kumar A, Mathur M, et al. Clinical significance of altered expression of retinoid receptors in oral precancerous and cancerous lesions: relationship with cell cycle regulators. *Int J Cancer* 2006;118(5):1077-89.

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

Rhee JC, Khuri FR, Shin DM. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist* 2004;9(3):302-11.

Rheinwald JG, Beckett MA. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1981;41(5):1657-63.

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

Sarno JL, Kliman HJ, Taylor HS. HOXA10, Pbx2, and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):522-8.

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

Shen R, Chen Y, Huang L, Vitale E, Solursh M. Characterization of the human MSX-1 promoter and an enhancer responsible for retinoic acid induction. *Cell Mol Biol Res* 1994;40(4):297-312.

Shimizu H, Lee GS, Beedanagari SR, Collins MD. Altered localization of gene expression in both ectoderm and mesoderm is associated with a murine strain difference in retinoic acid-induced forelimb ectrodactyly. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007;79(6):465-82.

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

Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F. Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 1990;346(6286):763-6.

- Simeone A, Acampora D, Nigro V, Faiella A, D'Esposito M, Stornaiuolo A et al. Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. *Mech Dev* 1991;33(3):215-27.
- Soprano KJ, Soprano DR. Retinoic acid receptors and cancer. *J Nutr* 2002;132(12):3809S-3813S.
- Spandidos A, Wang X, Wang H, Dragnev S, Thurber T, Seed B. A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. *BMC Genomics* 2008;9:633.
- Stornaiuolo A, Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Morelli F, Migliaccio E, et al. Human HOX genes are differentially activated by retinoic acid in embryonal carcinoma cells according to their position within the four loci. *Cell Differ Dev*. 1990;31(2):119-27.
- Swift ME, Wallden B, Wayner EA, Swisshelm K. Truncated RAR beta isoform enhances proliferation and retinoid resistance. *J Cell Physiol* 2006 Dec;209(3):718-25.
- Tommasi S, Karm DL, Wu X, Yen Y, Pfeifer GP. Methylation of homeobox genes is a frequent and early epigenetic event in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(1):R14.
- Vuocolo S, Soprano DR, Soprano KJ. p27/Kip1 mediates retinoic acid-induced suppression of ovarian carcinoma cell growth. *J Cell Physiol* 2004;199(2):237-43.
- Wang X, Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31(24):e154.
- Wood HB, Ward SJ, Morriss-Kay GM. Effects of all-trans-retinoic acid on skeletal pattern, 5'HoxD gene expression, and RAR beta 2/beta 4 promoter activity in embryonic mouse limbs. *Dev Genet* 1996;19(1):74-84.
- World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. IARC press Lyon, France. Organização Mundial da Saúde; 2005: p.168.

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

Wrangle JM, Khuri FR. Chemoprevention of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Opin Oncol* 2007;19(3):180-7.

Wu S, Donigan A, Platsoucas CD, Jung W, Soprano DR, Soprano KJ. All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1. *Exp Cell Res* 1997;232(2):277-86.

Xiao B, Guo J, Lou Y, Meng D, Zhao W, Zhang L, et al. Inhibition of growth and increase of alkaline phosphatase activity in cultured human oral cancer cells by all-trans retinoic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35(7):643-8.

Yang CC, Tu SF, Chang RC, Kao SY. In vitro cellular response of retinoic acid treated human oral cancer cell lines. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2001;64(6):357-63.

Zhao GQ, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. The gene for the homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embryonic development. *Mech Dev* 1994;48:245-54.

Zhao GQ, Zhou X, Eberspaecher H, Solursh M, de Crombrughe B. Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(18):8633-7.

Zhao XH, Zhu HJ, Lu DP, Zhang M. Immunofluorescence examination of CK-13 expression in cell line KB differentiated by all-trans retinoic acid or As2 O3. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2009;44(1):53-5.

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

ANEXO A – Parecer do Comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 03/08

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa: **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES HOXD10 E HOXD11 NO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO E PARADA DO CRESCIMENTO CELULAR PROMOVIDA PELO ÁCIDO RETINÓICO EM LINHAGENS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA"**, de responsabilidade da Pesquisadora **THAÍS ACQUAFREDA ANTUNES**, sob orientação do Professor Doutor **FABIO DAUMAS NUNES**.

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

São Paulo, 04 de março de 2008

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

ANEXO B – Distribuição dos 84 genes homeobox estudados e os controles na placa de PCR array.

ANEXO C – Resultados dos controles para contaminação com DNA genômico e transcriptase reversa.

PCR Array Performance and Quality Control		SCC-9 Retinoic Acid
PCR Array Catalog Number:	PAHS-083	SCC-9 Ethanol

1. PCR Array Reproducibility:

SCC-9 Retinoic Acid					
Well	exp1	exp2	exp3	AVG exp(1-10)	ST DEV exp(1-10)
Average C_t (PPC)	16.04	17.56	16.65	16.75	0.76
ST DEV C_t (PPC)	0.31	0.17	0.14	0.20	--
Average C_t (RTC)	20.19	20.99	20.17	20.45	0.47
ST DEV C_t (RTC)	0.05	0.05	0.08	0.06	--
SCC-9 Ethanol					
Well	exp1	exp2	exp3	AVG exp(1-10)	ST DEV exp(1-10)
Average C_t (PPC)	16.16	16.61	16.87	16.55	0.36
ST DEV C_t (PPC)	0.13	0.16	0.25	0.18	--
Average C_t (RTC)	20.42	20.17	20.11	20.24	0.16
ST DEV C_t (RTC)	0.07	0.02	0.01	0.03	--

2. Reverse Transcription Control (RTC):

SCC-9 Retinoic Acid			
Well	exp1	exp2	exp3
ΔC_t (AVG RTC - AVG PPC)	4.15	3.43	3.52
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass
SCC-9 Ethanol			
Well	exp1	exp2	exp3
ΔC_t (AVG RTC - AVG PPC)	4.26	3.56	3.24
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass

3. Genomic DNA Contamination (GDC):

SCC-9 Retinoic Acid			
Well	exp1	exp2	exp3
C_t (GDC)	33.55	34.33	33.36
Genomic DNA:	Pass	Pass	Pass
SCC-9 Ethanol			
Well	exp1	exp2	exp3
C_t (GDC)	33.50	33.48	33.01
Genomic DNA:	Pass	Pass	Pass

PCR Array Performance and Quality Control		SCC-25 Retinoic Acid
PCR Array Catalog Number:	PAHS-083	SCC-25 Ethanol

1. PCR Array Reproducibility:

SCC-25 Retinoic Acid					
Well	exp1	exp2	exp3	AVG exp(1-10)	ST DEV exp(1-10)
Average C_t (PPC)	16.93	17.28	16.86	17.02	0.23
ST DEV C_t (PPC)	0.66	0.06	0.12	0.28	--
Average C_t (RTC)	21.49	21.12	20.54	21.05	0.48
ST DEV C_t (RTC)	0.05	0.04	0.08	0.05	--
SCC-25 Ethanol					
Well	exp1	exp2	exp3	AVG exp(1-10)	ST DEV exp(1-10)
Average C_t (PPC)	18.40	17.42	16.69	17.50	0.86
ST DEV C_t (PPC)	4.48	0.20	0.07	1.58	--
Average C_t (RTC)	20.30	20.23	20.12	20.22	0.09
ST DEV C_t (RTC)	0.05	0.09	0.06	0.07	--

2. Reverse Transcription Control (RTC):

SCC-25 Retinoic Acid			
Well	exp1	exp2	exp3
ΔC_t (AVG RTC - AVG PPC)	4.56	3.84	3.68
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass
SCC-25 Ethanol			
Well	exp1	exp2	exp3
ΔC_t (AVG RTC - AVG PPC)	1.90	2.81	3.43
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass

3. Genomic DNA Contamination (GDC):

SCC-25 Retinoic Acid			
Well	exp1	exp2	exp3
C_t (GDC)	33.14	35.00	35.00
Genomic DNA:	Pass	Pass	Pass
SCC-25 Ethanol			
Well	exp1	exp2	exp3
C_t (GDC)	34.72	34.22	35.00
Genomic DNA:	Pass	Pass	Pass

ANEXO D – Cópia do artigo que foi enviado para a publicação referente a esse trabalho

SUMMARY

Oral squamous cell carcinoma (OSCC), the most frequent oral cancer, may arise from potentially malignant oral lesions. Retinoic acid (RA), which plays a role in cell growth and differentiation, has been frequently studied as a possible chemotherapeutic agent in the prevention of this progression. While the mechanism by which RA prevents progression and suppresses cell growth has not been completely elucidated, it is known that homeobox genes represent important targets of RA during embryogenesis and differentiation. In order to determine if modulation of the expression of these genes is involved in inhibition of OSCC cell growth by RA, a PCR array was performed to evaluate the expression of 84 homeobox genes in RA sensitive SCC-25 cells compared to RA resistant SCC-9 cells following treatment with RA. Results showed that 9 homeobox genes are down-regulated and 4 are up-regulated by RA. Regulated expression was confirmed for 7 of these genes by qPCR. In addition, expression of several potentially differentially expressed homeobox genes was also evaluated on samples treated with RA for 3, 5 and 7 days. Three different patterns of gene expression were observed. Homeobox gene ALX1 showed down-regulation only on day 7. Homeobox gene DLX3 showed reduced expression on day 3 but increased expression on day 7. Homeobox TLX1 showed a substantial down-regulation on day 5 and day 7 but not on day 3. The data presented show that a number of homeobox genes are modulated by RA in OSCC cell lines. However, these genes do not appear to be direct targets of RA dependent OSCC growth suppression but instead act as downstream effectors of RA signaling.

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common oral malignancy. Despite the fact that significant effort has been devoted to identification of disease and prognostic

markers and improve treatment options, 5-year survival rate remains around 50% (KIM; CALIFANO, 2004). A major problem associated with OSCC treatment is related to development of second primary tumors (SPT), which presents a risk of 2-7% per year in long term survivors. In order to improve survival rates, recent research has focused on the use of chemoprevention agents, such as retinoic acid (RA), α -tocopherol and β -carotene to block or reverse the carcinogenesis process (RALHAN R et al., 2006). RA has been tested in clinical trials for chemoprevention. However, problems related to toxicity and disease relapse have prevented development of a definitive treatment protocol. Also, previous studies utilizing OSCC cell lines have shown that OSCC cell growth can be suppressed by treatment with RA (Le et al. 2000; 2002). Therefore, RA treatment of OSCC cell lines may represent a good in vitro model to study the molecular mechanism of retinoid mediated OSCC growth suppression. Identification of cellular and molecular mechanisms triggered following RA treatment of OSCC may lead to the development of new strategies to reduce toxicity and disease relapse, thereby improving patient treatment and survival rates. (HONG et al, 1986; LIPPMAN et al, 1993; WRANGLE; KHURI, 2007).

Retinoids are a large family of natural and synthetic derivatives of retinol (vitamin A) that promote differentiation and regulate cell growth in both embryonic and adult tissues. The ability to affect cell growth and differentiation of various cell types is related to the ability of RA to alter the expression of a wide variety of gene types. This is likely to be the reason why no single common mechanism of RA action has been identified (SOPRANO; SOPRANO, 2002; MONGAN; GUDAS, 2007).

One important mechanism by which RA exerts its action is mediated by homeobox genes, especially the HOX family. Homeobox genes represent a large family of transcription factors that regulate cell fate and differentiation. In mammals, over 200 homeobox genes have been described and are divided in two families, clustered homeobox, also called HOX, and non-clustered. HOX genes participate in positional specification of the anterior-posterior axis in the developing embryo. They are expressed in a manner that genes located at the 3' end of the gene cluster are expressed at the anterior portion of embryo and earlier in

development, while genes at the 5' end are expressed at posterior areas and latter during development (MARK; RIJLI; CHAMBONM, 1997; CILLO et al., 2001; ABATE-SHEN, 2002). It has been shown that RA can partially influence this expression pattern. Studies of embryonal carcinoma cell lines treated with various RA concentrations for different periods of time demonstrated that HOX genes located near the 3' end are induced extremely rapidly by low RA concentrations. It was also observed that as the distance from the 3'end increases, time and RA concentration required for gene induction also increased. Genes located at the 5' region, generally, do not have their expression activated by RA. (STORNAIUOLO et al, 1990; SIMEONE et al, 1991; LANGSTON; GUDAS, 1994). Additional evidence that RA is an important regulator of homeobox gene expression comes from the fact that retinoic acid responsive elements (RARE) have been identified in the promoters of HOXA1, HOXB1, HOXD4, CDX1 and MSX1 (SHEN et al., 1994; MORRISON et al. 1996; LANGSTON; THOMPSON; GUDAS, 1997; LICKERT, KEMLER; 2002). The importance of homeobox genes for cell differentiation has raised the question whether these genes might have an altered expression during carcinogenesis. Studies have already demonstrated the relationship between several types of cancer such as breast, lung, endometrial, esophagus and OSCC and altered expression of these genes (ZHU et al. 2004; CHEN et al. 2005; HASSAN et al. 2006; RAUCH et al. 2007; TOMMASI et al. 2009; YAMAGUCHI et al. 2009).

The present work compared the expression of 84 homeobox genes in RA sensitive versus RA resistant OSCC cell lines following treatment with RA. Our results show that the expression of a limited number of homeobox genes are differentially regulated in OSCC cells growth inhibited by RA. However, the time course of homeobox gene expression suggests that these genes do not directly mediate cell differentiation and growth arrest by RA but instead are downstream effectors of RA signaling in these OSCC cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

For this study, human squamous cell carcinoma of tongue cell lines SCC-9 and SCC-25 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). Cell lines were cultivated in 100mm cell culture dishes with a 1:1 mixture of Dulbecco's modification of Eagle's medium and Ham's F-12 (GIBCO, Invitrogen Corporation; Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Mediatech Cellgro; Herndon, VA, USA), 2mM L-glutamine (HyClone, Thermo Fisher Scientific; Logan, UT, USA), 100 units/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin (Mediatech Cellgro) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cell counting was performed using a hemocytometer chamber. Trypsinized cells were mixed with 0.4% trypan blue (GIBCO, Invitrogen Corporation) in a ratio of 1:1 and 10µl of the cell suspension was loaded in the chamber. All cell counts were performed in triplicated.

Cell proliferation

Powder form of all-trans retinoic acid (atRA) was kindly provided by Hoffmann-LaRoche, Inc. (Nutley, NJ, USA). Stock solutions (10⁻³M) were prepared in ethanol and stored at -20°C. For quantitative assays of cell proliferation following RA treatment of SCC-9 and SCC-25 cell lines, 1X10⁵ cells were seeded in 100mm plates in regular growth medium and atRA for a final concentration of 10⁻⁶M (SOPRANO; SOPRANO, 2002), was added to the cell medium culture. Cell medium was changed every 2 days and atRA at 10⁻⁶M was replaced. Control cultures were treated with an equivalent amount of ethanol for the same time period. Cell counting was performed on days 1, 3, 5 and 7 in triplicate. All procedures involving atRA were performed under subdued light.

PCR array

After atRA treatment, SCC-9 and SCC-25 cells were rinsed twice with 1X PBS and detached from the culture plate using 1X trypsin (GIBCO, Invitrogen Corporation). RNA isolation was performed with the RT² qPCR-Grade RNA Isolation Kit (SABiosciences; Frederick, MD, USA), as recommended by the PCR Array protocol. RNA amount and purity

was determined using a spectrophotometer (Beckman - Du 640). OD260/OD280 ratio for all samples was between 1.9 and 2.1. RNA samples were stored at -70°C. cDNA synthesis of 2µg of RNA of each sample was performed using RT² First Strand Kit (SABiosciences), according to the manufacturer protocol. For each sample, RT product was diluted in 91µl of double distilled water and kept at -20°C. PCR array plates were purchased from SABiosciences for 84 homeobox genes and complete gene list can be observed at the supporting material. PCR array cocktail was prepared with 2X SABiosciences RT2 qPCR master mix (SABiosciences) according to manufacturer protocol and 25µl of the cocktail was distributed in each of the 96 wells from the PCR Array plates. Gene expression profile was determined using the Applied Biosystems 7500 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with cycling conditions indicated by the manufacturer. For all PCR array plates, controls for genomic DNA contamination and reverse transcription were performed in accordance with optimal conditions required for success of PCR array experiments as suggested by the supplier.

qPCR validation and time-course analyses

SCC-9 and SCC-25 cell lines were treated with atRA or ethanol for 3, 5 and 7 days and RNA isolation was performed with RNA-Bee solution (Iso-Tex Diagnostics, Inc – Friendswood, TX, USA) , following the instructions provided by the manufacturer. RNA amount and purity were evaluated as previously described and samples were stored at -70°C. cDNA was synthesized using RT-PCR first strand cDNA synthesis kit (BD Biosciences, Clontech Laboratory Inc., Mountain View, CA, USA) using 1µg of total RNA according to the manufacturer's protocol. Each cDNA was further diluted with 80µl of DEPC-treated water to obtain a final volume of 100µl and stored at -20°C. Real time quantitative PCR was performed in a 7500 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 96 well plates using the SYBR green method. Primer sequences used in this work are listed in Table1. Sequences were obtained from Primer Bank (WANG, SEED, 2003; SPANDIDOS et al., 2008). DLX6 primers were purchased from SABiosciences (catalogue number is

PPH15032A). All primer sets yielded a dissociation curve with a single peak and a single DNA product of the appropriate size when separated by electrophoresis on an acrylamide gel. For each sample a mix containing 15µl of cDNA, 50µl of SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 200nM of each primer and double distilled water up to a volume of 100µl was prepared and properly mixed. 30µl of the mix was distributed in three different wells in order to obtain triplicate samples. qPCR reactions were incubated at 50°C for 2 minutes, followed by an initial denaturation step at 95°C for 10min. This was followed by 40 amplification cycles that consisted of a 15 sec denaturation step at 95°C, a 30 sec annealing step at 60°C and a 40 sec extension step at 68°C. All procedures were performed with three separately isolated RNA samples. .

Data analyses and statistics

PCR array data was normalized using the average of 5 housekeeping genes (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB) included in the PCR array plate. Individual qPCR reactions were normalized using hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1). All analyses were conducted using relative quantification analyses based on the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Fold change was calculated between ethanol and RA groups for each cell line. All experiments were performed in triplicate and results presented as the mean +/- standard deviation. Student's *t*-test was used to determine statistical significance. P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Cell proliferation

The effect of RA treatment on OSCC cell growth was determined. Direct cell counting was used to generate 7 day cell growth curves for two OSCC cell lines, SCC-9 and SCC-25, following treatment with atRA (10^{-6} M) or ethanol. As can be seen in Figure 1A, SCC-9 cells exhibited similar cell numbers over the 7 day treatment period when treated with either RA or

ethanol. Figure 1B plots the data as percentage of cell growth inhibition. Since a similar cell number was observed following treatment with either RA or ethanol at each time point, no growth inhibition was observed. Thus, this cell line was considered resistant to RA treatment (Fig. 1b). In contrast, SCC-25 cells treated with RA exhibited a lower growth rate compared to cells treated with ethanol (Fig. 1a). This growth inhibition increased over time and showed maximum inhibition on day 7, when an inhibition rate of 42% was observed ($p < 0.01$). Based on these results the SCC-25 cell line was considered sensitive to RA treatment (Fig. 1b).

PCR array

We wished to determine if homeobox gene expression mediates RA effects on OSCC cells growth. A commercially prepared homeobox gene PCR array containing 84 HOX genes was utilized for these experiments. Having established that SCC-25 cells were sensitive to RA effects on growth and SCC-9 cell were not, we treated SCC-9 and SCC-25 cells with either ethanol or RA (10^{-6} M) for 7 days. On day 7, total RNA was isolated from each treatment group. The mean inhibition rate obtained in three independent sets of cells used for the PCR array was 6.5% ($\pm 5.7\%$) for SCC-9 cells and 43.3% ($\pm 3.2\%$) for SCC-25 cells.

Analysis of threshold cycle values for both cell lines is presented in Table 2. According to PCR array parameters, genes with Ct values lower than 25 should be considered as highly expressed and those with Ct values higher than 35 as not expressed. Ct values for each gene in the array were determined for both SCC-9 and SCC-25 cell lines treated with RA or ethanol. Our analysis showed differences in homeobox gene expression in SCC-9 cells compared to SCC-25 cells. For example, in SCC-9 cells, 24 of the genes were not expressed while 9 genes were highly expressed. In SCC-25 cells, 13 genes were not expressed while 13 genes were highly expressed. When comparing these results, 13 of the not expressed and 7 of the highly expressed homeobox genes were common to both cell lines (Table 3).

PCR array results were analyzed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using as an internal normalizing control the average of 5 housekeeping genes for each PCR array experiment

and all analyses were performed comparing RA and ethanol treated samples. Results with 2-fold difference were considered positives. Among the 84 genes evaluated, SCC-9 cells exhibited two genes whose expression was upregulated (HOXD12 and PROX1) and two downregulated (MSX2 and MEOX1) by RA. When the same analysis was performed for SCC-25, nine genes showed a down-regulation by RA treatment greater than 2-fold (ALX1, ALX4, DLX3, DLX6, HLX, HOPX, MEOX1, SIX3 and TLX1), while four genes were up-regulated (EN2, HOXB3, HOXD1 and VAX1) by RA. Fold induction, standard deviation and p value for these genes are shown in Table 3.

Validation by qPCR

Genes showing a 2-fold downregulation in RA sensitive SCC-25 cells, and not showing significant changes in RA resistant SCC-9 cells, were considered to be the best candidates for RA target genes mediating growth suppression. Genes fulfilling this criteria were selected for validation by qPCR using samples treated for 7 days. A total of 7 genes were analyzed (ALX1, DLX3, DLX6, HLX, HOPX, SIX3 and TLX1). Analysis of expression in SCC-9 cells showed that none of the genes exhibited a fold change greater than 2 (Fig. 2a). These results confirm the PCR array results which also showed no significant difference in the expression of these genes in SCC-9 cells following RA treatment. In contrast, results for qPCR analysis of SCC-25 cell samples confirmed that the expression of each of the seven genes evaluated was downregulated and fold change values were similar to those observed in the PCR array analysis (Fig. 2b). Statistical analysis showed that fold difference was statistically significant for six of the genes (ALX1, DLX3, HLX, HOPX, SIX3, TLX1). The only gene that did not show a statistically significant downregulation of expression was DLX6. These results confirm that these genes were downregulated during the growth-inhibition mediated by RA treatment in OSCC cells.

Time-course analyses

Next, we wished to determine if the downregulation of homeobox genes observed in the PCR array experiment and confirmed by qPCR represented a growth regulatory or growth regulated molecular event. Growth regulatory events are likely to mediate growth suppression while growth regulated events usually occur as a result or consequence of growth inhibition. We reasoned that homeobox gene downregulated expression would most likely represent a growth regulatory event if it was observed early following RA treatment, while reduction in expression late after RA treatment was most likely a result of the fact that cell growth was inhibited. Expression of homeobox genes that showed 3-fold or more downregulation (ALX1, DLX3, TLX1) was analyzed by qPCR on SCC-25 cell samples treated with RA for 3, 5 and 7 days. Figure 3 shows that ALX1 gene downregulation occurred on day 7 following RA treatment but not on days 3 and 5. A significant and similar level of downregulated expression of DLX3 was observed on day 3 and on day 5 following RA treatment. A slightly greater reduction in expression was observed on day 7. TLX1 did not show a significant down-regulation on day 3, but exhibited a significant downregulated expression on days 5 and 7 (Fig. 3).

DISCUSSION

Our study evaluates for the first time the expression of members of the homeobox gene family in OSCC cells that are growth suppressed following RA treatment. Our results showed that, from the 84 homeobox studied, thirteen were differently expressed following RA treatment. Among them, nine were downregulated and four were upregulated. A more detailed analysis of the gene expression following treatment of OSCC cells with RA for various periods of time was performed for three genes (ALX1, DLX3, TLX1). Results of this experiment suggest that downregulation most likely represented an indirect response to RA treatment. These results suggest that HOX gene downregulation occurred as a result of growth inhibition mediated by RA rather than a cause of RA growth inhibition.

RA has been previously shown to promote growth inhibition of OSCC cell lines such as SCC-15, SCC-25 and KB. A number of studies have shown that OSCC growth inhibition by RA is principally related to cell cycle arrest during G1 phase, does not involve induction of apoptosis or cell death, and is accompanied by an increase in cytokeratin 13 expression and alkaline phosphatase activity, suggesting that RA induces cell differentiation (LE et al., 2000, YANG et al., 2001, KURODA et al., 2005; XIAO et al., 2006; ZHAO et al., 2009). In the present work, SCC-25 cells exhibited a growth inhibition rate of ~42% after 7 days of RA treatment, consistent with previous reports. In contrast, SCC-9 cells did not exhibit growth inhibition following RA treatment. Differences in SCC-9 cell response to RA observed between this study and previous ones may reflect cell culturing differences. Nevertheless, this has no implications on the results of the present work, since in all steps of the present work SCC-9 cells behaved as a resistant cell line to RA growth suppression.

Identification of homeobox genes in OSCC that display high or undetectable expression levels was performed by evaluating Ct values obtained from PCR array, without consideration of cell treatment. In SCC-9 cells, 24 genes were not expressed and nine were highly expressed and SCC-25 cells displayed thirteen genes for each group. Differences in the number of genes identified for each cell line, might be due to the fact that these cells were isolated from different patients and present distinct biological behavior, reflecting differences between tumors they were isolated from (RHEINWALD; BECKETT, 1981). When the results for both cell lines were compared, noticed that thirteen genes were not expressed and seven genes were highly expressed in both cell lines and for that reason, they were considered highly or not expressed in OSCC. Further studies are necessary to determine if these findings are valid in other OSCC cell lines and also tumor samples. Among not expressed genes, only HOXB1 had been previously studied in OSCC, with similar results. HOXB7 and HOXC10, highly expressed in our study, have also been described in OSCC. HOXB7 showed similar results to previously published work. It was found to be highly expressed in OSCC, in comparison to normal mucosa and dysplasia, while HOXC10 did not

exhibit any statistical differences in the expression level between normal oral mucosa, dysplasia and OSCC. (WU et al., 2006; HASSAN et al., 2006).

When relative quantification analyses were performed for ethanol- versus RA- treated cells, both cell lines exhibited genes with two or more fold change in expression. SCC-9 cells exhibited four genes in this category, two upregulated (PROX1 and HOXD12) and two downregulated (MEOX1 and MSX2). Considering that this cell line did not show changes in cell growth following RA treatment, it is likely that these four genes might be related to other cell process such as, cell growth and adhesion. In fact MSX2 and PROX1 expression have been associated to cell adhesion during tumorigenesis. Mouse mammary epithelial cells overexpressing MSX2 revealed downregulation of E-cadherin, upregulation of vimentin and N-cadherin and cell had higher invasive capacity (DI BARI et al., 2009). PROX1 has been shown to contribute to tumor progression by suppressing cell adhesion and regulating actin cytoskeleton in colorectal cancer (PETROVA et al., 2008).

SCC-25 cell line exhibited nine genes down-regulated and four up-regulated after RA treatment. Homeobox genes, especially the HOX family, have been described as RA inducible during embryo development and RAREs were identified in the promoter sequences of four of these genes (HOXA1, HOXB1, HOXD4 and CDX1). For that reason, our expectation was to identify a number of genes with upregulated expression following RA treatment. Our results, presented here, however, show that from the 84 genes evaluated, only thirteen were differently expressed and none of these genes were those with previously identified RAREs. Another interesting aspect from our data is that the majority of genes differently expressed were downregulated instead of upregulated. Gene profiles observed might be related to the homeobox expression pattern during carcinogenesis. Homeobox genes are known to be master regulators of development whose aberrant expression in cancer can present three patterns. In the first two patterns, homeobox genes exhibit a gain of expression in the tumor compared to the tissue that gives rise to the tumor, however in one case the gene was expressed in the respective embryonic tissue and in the other it was not. The third pattern presents a loss of gene expression in cell tumor compared to the cell in fully

differentiated state (ABATE-SHEN, 2002). The common characteristic among the three patterns is that the aberrant expression of homeobox genes lead cells to a less differentiated and embryonic-like state with enhanced proliferation and cell survival. Under this aspect, it is likely that the up or downregulation observed after RA treatment represents the return of homeobox gene expression to a pattern more similar to the one observed in fully differentiated oral epithelium, since it is known that OSCC undergoes differentiation following RA treatment. It is also important to note the fact that more downregulated genes were identified. This suggests that the gain of homeobox expression during oral carcinogenesis may be a more usual mechanism than the loss of expression. Studies comparing expression of homeobox genes identified by this study in normal oral mucosa, dysplasia and more and less aggressive tumors identified might give better answers to this hypothesis.

Another interesting aspect that should be evaluated is that from thirteen genes differently expressed, ten showed fold-change values between two and three. If homeobox gene expression plays a major role mediating RA action in OSCC, it would be expected that a higher percentage of genes would be differently expressed accompanied by a greater fold change in expression values for some of the genes, similar to what was observed for ALX1 and VAX1. These data suggests that homeobox genes may not be a primary target of RA in OSCC. However it has been demonstrated that homeobox expression induced by RA can be modulated by other cell signaling pathways. For example, treatment of neural crest cells with RA induces HOXA2 expression. However, cell stimulation with BIO, a glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitor that activates canonical Wnt signaling, reduces HOXA2 previously expressed (ISHIKAWA; ITO; 2009). Mechanisms such as the one described can be particularly important in OSCC development, since several cell pathways may be altered, and they could possibly interfere with RA signaling and homeobox expression.

It is interesting to note that MEOX1, which participates in somite development, has been described to be overexpressed in Wilm's Tumor and predicted to be involved in mesenchymal-epithelial transition, was the only gene found to be down-regulated in both, SCC-9 and SCC-25, with fold change of -6.15 and -3.06, respectively (LI et al, 2002; BARD

et al. 2008). Since the SCC-9 cell line is not growth inhibited by RA, MEOX1 down-regulation observed here is probably related to some mechanism other than cell differentiation and cell cycle arrest promoted by RA. Since MEOX1 downregulation has been shown to be triggered by ALR (MLL2) knockdown in a cervical cancer cell line and is followed by cytoskeleton reorganization and tumorigenicity decrease (ISSAEVA et al., 2007). It is possible that MEOX1 may be involved in cytoskeleton reorganization.

Since the PCR array method is based on the use of qPCR technology to screen genes differently expressed under experimental conditions, it is more quantitative and reproducible than microarray. Since qPCR is used in this method, one could argue that validation is not necessary; however we chose to perform this step to certify that results from the PCR array were valid and reproducible. Since downregulation of homeobox genes with RA seemed to be an important aspect in OSCC, we focused on genes that were downregulated. From the nine genes in this category, genes with greater down-regulation were selected for further study. MEOX1, which was also down-regulated in SCC-9 cells, was excluded from this evaluation. Seven genes were selected for validation (ALX1, DLX3, DLX6, HLX, HOPX, SIX3 and TLX1). Results confirmed that in RA resistant OSCC cells, these genes did not show significant changes in expression (Fig. 2a) while in the RA sensitive OSCC cells, all of these genes showed downregulated expression greater than 2 fold (Fig. 2b).

Three-fold downregulated genes were submitted to a time course analyses. During this step, expression levels were evaluated in SCC-25 cell samples treated with RA for 3, 5 and 7 days. ALX1, also called CART1, is mostly related to skeletogenesis, especially from head, and neural tube development. In cancer development, its expression was described only in chondrosarcoma cell line, not in any epithelial tumor (ZHAO et al., 1993; QU et al., 1999). The present work observed that ALX1 did not exhibit a fold change significant on days 3 and 5 of RA treatment of OSCC, however on day 7 it was -9.07 ($p=0.0036$) indicating that the down-regulation of ALX1 after RA treatment occurs later after cell treatment. This result suggests that reduction in ALX1 expression following RA treatment is mediated by other factors.

DLX3 (distal-less homeobox 3) is a homeobox gene from the distal-less sub-family and is located on the long arm of chromosome 17 (17q21) (MERLO et al., 2000). DLX3 role in humans is mostly related to osteogenesis and craniofacial development and its expression has also been described in placenta, epidermis, tooth and hair follicle (PRICE et al., 1998; MORASSO; MAHON; SARGENT, 1995; MORASSO et al., 1999; HASSAN et al., 2004). One major pathway in which DLX3 participates is involved in p63 regulation, which has an important role in development and maintenance of stratified epidermis. There are six p63 isoforms known that results from of the presence (TA) or absence (Δ N) of N terminal transactivation domain and alternative splicing at the C terminus (α , β , γ). It has been demonstrated that p63 isoforms TAp63 α and TAp63 γ , respectively, activates or represses DLX3 transcription. Interestingly, DLX3 induces Raf1 phosphorylation, which leads to phosphorylation followed by degradation of Δ Np63 α (Fig. 4). The role played by DLX3 in p63 isoforms regulation might be relevant in oral carcinogenesis, since Δ Np63 α , the p63 isoform degraded by DLX3, has been described in OSCC and its loss is associated with an increase in cell invasion capacity (HIGASHIKAWA et al. 2007, RADOJA et al., 2007; MORETTI; COSTANZO et al., 2009; DI COSTANZO et al., 2009). In this study, DLX3 fold change values were lower than 2 at all time points evaluated. Additionally, it was observed that on days 3 and 5, fold change values were respectively, -2.59 ($p=0.0247$) and -2.23 ($p=0.0945$). However, on day 7 a further increase in downregulation was detected, when fold change value was -4.24 ($p=0.0055$). This indicates that in contrast to our results with ALX1, DLX3 expression presents a more rapid and consistent downregulation. In the literature only one study correlated DLX3 and RA. Authors evaluated gene expression in limb development after RA treatment and showed that DLX3 exhibited downregulation, a result which is consistent with our data (Shimizu et al., 2007).

TLX1 (HOX11) is a homeobox gene whose expression in mouse embryo has been described in organs and tissues derived from the three germ cell layers but its role in cancer development still unclear. It was initially described as a proto-oncogene in acute lymphoblastic leukemia where translocation on chromosome 10 leads to TLX1

overexpression (HATANO et al. 1991). However, methylation-driving gene silencing of TLX1 has been demonstrated to be an early event in breast cancer development and might contribute to tumor development (TOMMASI et al., 2009). Our data demonstrated that TLX1 exhibits significant down-regulation on day 5 (-3.01; $p=0.0031$) and 7 (-2.82; $p=0.0209$), but not on day 3 (-1.13; $p=0.1620$). This result suggests that TLX1 is not downregulated until later after RA treatment (day 5) but this reduced expression is sustained over time. Since this loss of expression occurs later after RA treatment, it is more likely it is mediated by an indirect mechanism or as result of changes in the growth of the cells.

These analyses indicate that the modulation of the three genes by RA is mostly through an indirect effect. However expression of DLX3, which showed a significant down-regulation on day 3, should be evaluated at earlier time points following RA treatment. It is possible that downregulation of DLX3 might occur more rapidly following RA treatment and therefore might represent a direct target of RA, mediating growth inhibition.

In summary, our studies show that HOX genes, including those previously described as RA responsive, are not direct targets of RA responsible for mediating RA dependent OSCC growth suppression but instead act as downstream effectors of the RA signaling pathway.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effects of RA (10^{-6} M) treatment on cell proliferation of oral squamous cell carcinoma cell lines SCC-9 and SCC-25 according to the different days of treatment. (a) Cell number was monitored by direct cell counts using a hemocytometer after 1, 3, 5 and 7 days of treatment. SCC-9 cells treated with the vehicle ethanol (■) (and RA (♦)) had a similar cell number at all time points evaluated. SCC-25 cells treated with RA (▲) exhibited a lower cell number when compared to ethanol (x) on days 3, 5 and 7 and this difference increased over time. (b) Inhibition rate for both cell lines were calculated at all time points and evidenced that SCC-9 cells (♦) were not growth inhibited by RA treatment while SCC-25 (■) showed an

increasing level of inhibition under the same conditions which was statistic significant on day 7. * = P value <0.01.

Fig. 2. Fold change in expression of genes identified in the PCR array after validation by qPCR. (a) Gene expression in SCC-9 cells confirmed results obtained by PCR array since none of the seven genes studied presented a fold change higher than 2 * = pValue <0.05; ** = P value <0.03. (b) Fold change values for SCC-25 cells confirmed that all genes are down-regulated under treatment with RA for seven days and the results obtained are similar to the ones observed for PCR array * = P value <0.05, ** = P value <0.02.

Fig. 3. Fold change in expression of ALX1, DLX3 and TLX1 in SCC-25 samples treated with RA for 3, 5 and 7 days. Genes that presented 3-fold down-regulation had their expression evaluated in SCC-25 samples treated for 3, 5 and 7 days. * = P value <0.03 and ** = P value <0.01 for each day studied; () = P value < 0.05 and () = P value < 0.03 for analyses between the distinct days studied.

Fig. 4. Mechanisms of DLX3 activation and interaction. p63 isoforms TAp63 α and TAp63 γ , respectively, activates and repress DLX3 transcription. RA is also predicted to repress DLX3 transcription. DLX3 promotes Raf1 activation which leads to ubiquitination and degradation of Δ Np63 α . Raf1 in a feed-back loop, activates DLX3.

TABLES

Table 1

Table 1 – Primers used for qPCR analyses.

<i>Gene</i>	<i>Accession n°</i>	<i>Primer 5' → 3'</i>	<i>Position</i>	<i>Product Size</i>
ALX1	NM_006982	F: AATGTCTCCCGTGAAAGGGAT R: GTTCGGTGCCTCCGTTTCTTA	313-333 414-394	102
DLX3	NM_005220	F: TTA CTG C C C C A A G T C G G A A T A R: A G T A G A T T G T A C G C G G C T T T C	463-483 635-615	173
DLX6	NM_005222	-----	-----	66
HLX	NM_021958	F: C A G G T C C C T A T G C T G T G C T C R: G C T T G G T C A C G T A C T T C T G A A T	1212-1231 1352-1331	141
HOPX	NM_139211	F: G A C A A G C A C C C G G A T T C C A R: G T C T G T G A C G G A T C T G C A C T C	226-244 372-352	147
HPRT	NM_000194.1	F: T T C T T T G C T G A C C T G C T G G R: T C C C C T G T T G A C T G G T C A T	305 -323 423-405	119
SIX3	NM_005413	F: A A G A G T T G T C C A T G T T C C A G C R: G G A T C G A C T C G T G T T T G T T G A	431-451 601-581	171
TLX1	NM_005521	F: C A C G C A G A G C C C A T T A G C T T R: G G C C G T A T T C T C C G T C C T G	1055-1074 1157-1139	103

Table 2

Table 2 – Average and standard deviation of number of genes within each cycle threshold (Ct) value range for SCC-9 and SCC-25 samples.

<i>Ct range</i>	<i>SCC-9</i>		<i>SCC-25</i>	
	<i>Ethanol</i>	<i>Retinoic Acid</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Retinoic Acid</i>
< 25	9.67 (±3.51)	10.33 (±2.31)	13.33 (±2.93)	17.00 (±1.73)
25 – 30	28.00 (±2.00)	28.67 (±2.08)	39.67 (±0.58)	37.00 (±2.65)
30 – 35	22.33 (±5.03)	22.67 (±1.53)	18.00 (±3.61)	15.67 (±0.58)
> 35	24.00 (±2.46)	22.33 (±2.52)	13.00 (±1.00)	14.33 (±2.31)

Table 3

Table 3 – Genes that had no expression or were highly expressed in SCC-9 and SCC-25 cell lines treated with ethanol and retinoic acid. Genes in bold were observed for both cell lines and classified as not or highly expressed in OSCC.

<i>Genes with no expression</i>					<i>Genes highly expressed</i>			
SCC-9			SCC-25		SCC-9		SCC-25	
ALX4	HOXB1	PITX3	ARX	PHOX2B	CUX1	SIX4	CUX1	PDHX
ARX	HOXC12	PROP1	CDX1	PITX3	HOXB7	---	DLX2	PITX1
BARX1	LBX1	SHOX	DLX5	PROP1	HOXB9	---	DLX4	PITX2
CDX1	LMX1A	SIX3	DRGX	SHOX	HOXC10	---	HOXB7	SIX1
CDX2	OPT	SIX6	HOXB1	VSX1	PDHX	---	HOXC10	SIX4
DLX5	OTX2	TLX1	LBX1	---	PITX1	---	HOXC13	---
DRGX	PAX3	VAX1	LMX1A	---	PITX2	---	HOXD11	---
EN1	PHOX2B	VSX1	OTX2	---	SHOX2	---	MSX2	---

Table 4

Table 4 – Genes that displayed up-or down-regulation in expression after treatment of SSC-9 cells and SSC-25 cells with RA by PCR array analysis.

	<i>Gene</i>	<i>Fold change</i>	<i>Standard Deviation</i>	<i>P value</i>
SSC-9	HOXD12	3.07	0.23	0.0883
	MEOX1	-6.15	0.16	0.0427
	MSX2	-2.97	0.34	0.0542
	PROX1	2.89	1.05	0.0617
SSC-25	ALX1	-7.66	0.10	0.0205
	ALX4	-2.12	0.33	0.0583
	DLX3	-2.44	0.08	0.0009
	DLX6	-2.48	0.06	0.0264
	EN2	2.22	0.67	0.0031
	HLX	-2.25	0.07	0.0020
	HOPX	-2.28	0.29	0.0249
	HOXB3	2.07	1.70	0.1504
	HOXD1	2.72	0.41	0.0002
	MEOX1	-3.06	0.11	0.0294
	SIX3	-2.23	0.39	0.0821
	TLX1	-2.38	0.48	0.2075
	VAX1	3.97	0.75	0.1081

FIGURES

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4