FERNANDA CAMPOS SOUSA DE ALMEIDA

**LOCALIZAÇÃO DE TRANSCRITOS DOS GENES WNT5A E
HOXB5 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO “IN SITU”**

São Paulo

2004

Fernanda Campos Sousa de Almeida

**Localização dos transcritos dos genes WNT5A E HOXB5
em carcinomas epidermóides de boca através da
técnica de hibridização “in situ”**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2004

MINHA ESCOLA

FOLHA DE APROVAÇÃO

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

São Paulo, de de 200

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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que mesmo sem entender exatamente o que eu faço e um pouco frustrados por não ter uma filha dentista, propriamente dita, sempre me apoiaram e respeitaram minha opção pela pesquisa

Paito e Mainha, amo vocês!!!

Às minhas irmãs que me agüentaram em mais uma etapa da minha vida.

Juli e Bebê, amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da USP, minha escola, pela acolhida, desde a graduação, amo esta escola e espero ter contribuído minimamente para com ela.

À Disciplina de Patologia Bucal, seu corpo docente, discente e funcionários, pelo respeito e confiança a mim depositados.

À Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço por ter despertado em mim a paixão e o desejo de estudar câncer de boca.

Ao meu orientador, Fabio, por ter confiado a mim parte de seu projeto e, apesar de nossas diferenças, ter respeitado meu trabalho e minhas opiniões.

Ao amigo e um dos coordenadores da fase clínica desse projeto Durazzo, por ter me ensinado o verdadeiro sentido da palavra MESTRE. Você sabe sua importância em mais este capítulo da minha história.

Ao Dr. Marcos Tavares, também coordenador da fase clínica do projeto, pela preciosa colaboração.

À Dra. Vera e Dr. Ney, obrigada por me receberem na Patologia apesar de possuímos posições diversas sobre alguns assuntos. Foi uma pena não ter podido desfrutar mais de suas orientações. Tenham certeza que a Disciplina perdeu um pouco de seu charme e graça sem vocês no corredor.

Ao Prof. Dr. Alberto Rosseti Ferraz, por ter, desde a primeira vez que entrei em sua secretaria, me recebido e, sem restrições, colaborado não só com esta dissertação, mas com toda minha trajetória de seis anos na DCCP.

Aos residentes e assistentes da DCCP, obrigada pela paciência e colaboração com a minha tese.

À minha amiga e irmã Graça, por ter dividido comigo suas experiências. Você foi sem dúvida peça fundamental para conclusão dessa tese e para meu aprendizado em Biologia Molecular.

À minha colega Renata Tucci, por ter iniciado o estudo do gene HOXB5 e ter generosamente cedido parte de sua produção intelectual para esta dissertação.

À minha amiga Claudia Cazal, só nós sabemos o que passamos e quanto choramos e sorrimos juntas.

Gabi e Thaizinha, obrigada pelos tumores coletados, dados clínicos levantados e reuniões assistidas, enfim, obrigada pela amizade.

À amiga e colega Silvia Vanessa Lourenço pela grata surpresa de ter te conhecido, obrigada pela disponibilidade e tardes dedicadas à leitura de textos e revisão de lâminas e resultados.

Ao amigo Dorival, por ter, com paciência e carinho me consolado e ajudado a encarar as dificuldades e desafios que encontrei no meio do caminho.

À minha enorme família, obrigada. Sintam-se todos citados e beijados.

Aos doentes e acompanhantes que, em meio à dor e, quem sabe, ao maior sofrimento de suas vidas, cooperaram com esta pesquisa.

À FAPESP pelo financiamento e ao (à) parecerista da FAPESP pelas críticas e palavras de incentivo durante análise dos relatórios.

**TODA HONRA, GLÓRIA E LOUVOR
SEJAM DADOS AO REI DOS REIS,
QUE FEZ O CÉU E A TERRA**

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

RESUMO

São freqüentes alterações em vias de sinalização de genes de desenvolvimento, no que diz respeito ao carcinoma epidermóide de boca (CEB). Vinte e nove casos de CEB e tecido não tumoral adjacente à neoplasia foram investigados através da técnica de hibridização “in situ”. Os transcritos dos genes WNT5A e HOXB5 foram observados em todos os casos de tumor. A hibridização “in situ” revelou que o WNT5A estava mais expresso em tumores bem diferenciados. Adicionalmente, observou-se transcritos do WNT5A em glândulas salivares menores, estroma glandular, estroma tumoral e alguns vasos sanguíneos. Entretanto, com respeito ao HOXB5 não foi possível estabelecer mudança do padrão do transcrito nos diferentes graus histológicos nas amostras de CEB. O HOXB5 também pôde ser identificado em alguns fragmentos de glândulas salivares menores, tecido muscular e em endotélio. Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão dos genes WNT5A e HOXB5 podem estar relacionadas com a diferenciação e progressão do câncer de boca.

Palavras chave: Carcinoma epidermóide – Câncer de boca – RT-PCR – Hibridização *in situ* – WNT5A – homeobox, HOXB5.

Almeida FCS. WNT5A e HOXB5 localization study in oral squamous cell carcinoma with in situ hybridization [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

ABSTRACT

Disruption in developmental genes pathway are common in oral squamous cell carcinoma (OSCC). This study investigated the pattern of expression of two developmental genes, WNT5A and HOXB5, in 29 cases of OSCC and adjacent non tumoral tissue using *in situ* hybridization technique. Transcripts for WNT5A and HOXB5 were detected in all tumoral samples. *In situ* hybridization technique demonstrated that WNT5A transcripts were mainly detected in well differentiated tumors when compared with moderately and undifferentiated OSCC. WNT5A transcripts were also observed in accessory salivary glands, glandular stroma, and vessels. Therefore, for the HOXB5 transcript it was not possible to stability a relationship with the tumoral histological grade. The expression of HOXB5 transcripts in non tumoral samples was detected in salivary glands, glandular stroma, endothelium, and muscle. Results suggest that WNT5A and HOXB5 genes play a possible role in tumor differentiation and cancer progression.

Key words: Squamous cell carcinoma – Oral cancer – Homeobox, HOXB5 – WNT5A – RT-PCR- *In situ* hybridization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

p.

Figura 2.2 - Diagrama da localização do gene WNT5A no genoma	32
Figura 2.3 - Diagrama da localização do gene HOXB5 no genoma	45
Figura 4.1 - Exemplo de gel de integridade de RNA.....	53
Figura 4.2 - Exemplo de gel de linearização	62
Figura 4.3 - Exemplo de gel de transcrição.....	63
Figura 5.1 - Achados adicionais dos genes WNT5A e HOXB5	72
Figura 5.2 - Localização do transcrito do gene WNT5A em epitélio normal e tumoral	74
Figura 5.3. Localização do transcrito do gene HOXB5	77
em tecido epitelial normal e tumoral	

LISTA DE QUADROS

p.

Quadro 2.1 – Classificação TNM/UICC.....	22
Quadro 4.1 - Iniciadores do gene da β actina	55
Quadro 4.2 – Iniciadores do gene WNT5A	57
Quadro 4.3 – Iniciadores do gene HOXB5	58
Quadro 4.4 – Lista de endonucleases de restrição utilizadas	62
Quadro 4.5 – Lista de RNA polimerases utilizadas	63

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APC	Adenomatous polyposis coli
BCIP	Bromocloroidodophosphato
C	Cortado
cDNA	DNA complementar
CEB	Carcinoma epidermóide de boca
DCC	Deleted in colon cancer
DCCP	Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
EGF	Epitheliun Growth Factor
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF	Fibroblast Growth factor
FOUSP	Faculdade de Odontologia da USP
Fzd	Frizzled
INCa	Instituto Nacional do Câncer
NC	Não cortado
ONSA	Organization for Nucleotides Sequencing and Analysis
Pb	pares de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Poymerase Chain Reaction
PRb	Proteína do retinoblastoma

RNA _m	RNA mensageiro
Rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT	Transcriptase Reverse
TA	Temperatura ambiente
TGF β	Tumor Growth Factor β
TN	Tecido normal
TU	Tumor
U	unidade
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra-violeta
WNT	família de genes em humanos homólogos ao wingless de drosófilas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
μl	microlitro
Ca^{2+}	cálcio
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
M	molar
mg	miligrama
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
β	Beta
α	alfa
$\text{\textcircled{R}}$	marca registrada

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Carcinoma epidermóide	20
2.2 Fatores prognóstico	23
2.3 Genes WNT.....	30
2.4 Genes homeobox.....	37
2.5 Relação entre HOX e WNT	45
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
5 RESULTADOS	68
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS.....	100

1 INTRODUÇÃO

A organização e viabilização da Rede ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis) pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), em maio de 1997, inseriu o Brasil no panorama mundial do seqüenciamento do genoma. Em 1999, o código genômico da *Xilella Fasridiosa* foi decifrado e nosso país demonstrou ao mundo seu potencial e competência para pesquisa. Em abril do mesmo ano, o Projeto Genoma Câncer era estruturado, também pela FAPESP, e em menos de um ano, aproximadamente, um milhão de seqüências de genes foram identificadas em alguns dos tumores mais freqüentes no Brasil.

Com tantos dados e informações a serem desvendados, o Projeto Genoma Clínico do Câncer foi então organizado e trabalha com neoplasias de quatro origens: as doenças linfoproliferativas, tumores gastrointestinais, neurológicos e de cabeça e pescoço. Portanto, de 1997 até o presente, o Brasil investiu na corrida mundial pelo código completo do genoma e se estabeleceu nesse contexto, à despeito das dificuldades e limitações que conjunturas geopolíticas e econômicas impõem ao nosso país .

Dentre os genes identificados pelo Projeto Genoma Câncer, alguns foram observados em tumores de cabeça e pescoço de diversas localizações e origens teciduais, dentre eles, genes de desenvolvimento embrionário de especial interesse para o laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP.

Nosso grupo, desde 2000 se propôs a identificar tais genes em carcinoma epidermóide de boca através da técnica de RT-PCR e localizar seus transcritos por hibridização “in situ”.

O estudo do RNA mensageiro, molécula responsável por codificar a tradução protéica, compõe passo fundamental na busca de respostas sobre a gênese e progressão do câncer de forma geral, e a interferência, por terapia gênica, em seqüências mutadas, bloqueando e super-expressando genes, parecem ser um promissor futuro para terapêutica do câncer. Neste contexto, complementando limitações do projeto genoma, um novo grande projeto surge no cenário da pesquisa mundial: O Proteoma.

A união do estudo do genótipo e fenótipo e o estabelecimento de suas relações auxiliarão a ciência a compreender o complexo processo da transformação maligna, tendo em vista que Genoma e Proteoma devem ser entendidos como processos e projetos que se complementam de forma interdependente e inseparável.

Cabendo ao nosso grupo, inicialmente, cerca de 20 genes, dois deles, alvo do estudo desta dissertação de mestrado, representam duas grandes famílias: a família WNT e a família homeobox. Os genes eleitos para esse estudo foram o WNT5A e HOXB5. Os dois genes, até o momento, não possuem nenhuma relação entre si e, portanto devem ser entendidos como entidades separadas sem qualquer interligação.

O WNT5A já descrito em neoplasias diversas, teve em 2002 a primeira publicação indexada identificando-o em tumores de cabeça e pescoço, após este período outros artigos foram divulgados sobre membros da família WNT e tumores de cabeça e pescoço, mas nenhum deles relacionando diretamente o WNT5A com

carcinoma epidermóide de boca (TAKI et al., 2004). O HOXB5, por sua vez, possui uma literatura bem mais restrita e até o momento não há relatos relacionando - o com tumorigênese na região cervico-facial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade bucal. O Instituto Nacional do Câncer (INCa) previu para o ano de 2003 mais de 19 casos de câncer de boca por 100.000 homens no Estado do Rio de Janeiro, seguido por 16,21 novos casos por 100.000 em São Paulo, e mais de 7 mulheres por 100.000 com possibilidade de apresentar esta doença no Rio de Janeiro. Foram estimados 305.000 novos casos de câncer, de diversas naturezas e localidades, com potencial risco de provocar aproximadamente 117.000 óbitos, constituindo assim a segunda causa de morte por doença. Dos 267.980 novos casos previstos para 2003 na Região Sudeste, 7.080 eram esperados ocorrer em cavidade oral, constituindo o 10º câncer em incidência. (www.inca.gov.br, acesso em 13 de Setembro de 2004).

A etiologia do carcinoma epidermóide de boca (CEB) é muito variada, não existindo um fator isolado como causa. Os mais conhecidos fatores de risco associados ao desenvolvimento do CEB ainda são o tabaco e o consumo do álcool (BANKFALVI ; PIFFKO, 2000; CANTO; HOROWITZ; CHILD, 2002; JORDAN ; DALEY, 1997; MARSHALL et al., 1992; VOKES et al., 1993). Acredita-se atualmente, que o desenvolvimento do CEB é um processo multifatorial, no qual

inúmeros fatores externos e somados às alterações genéticas podem estar envolvidos (LEETHANAKUL et al., 2000; SCHWARTZ, 2000; SCULLY et al., 2000; VOGELSTEIN ; KINZLER, 1993).

A carcinogênese é entendida como o resultado de um acúmulo, no genoma de uma célula, de alterações que se processam ao longo das múltiplas gerações celulares e, alteradas progressivamente características genotípicas e fenotípicas particulares, culminam na manifestação neoplásica (SABBAGA, 2000).

Estudos da genética do câncer nos mostram que algumas alterações são específicas de determinadas neoplasias, enquanto outras encontram-se em várias neoplasias diferentes, ou ainda que neoplasias histologicamente indistinguíveis podem diferir em suas alterações moleculares (SABBAGA, 2000). Portanto, traçar um perfil genético único para uma determinada neoplasia tem sido cada vez mais descartada, a tendência dos estudos é entender os mecanismos básicos de cada câncer, levando-se em conta a resposta do hospedeiro e interferência do meio em que ele vive (NUNES et al., 2003).

Com relação aos danos genéticos, eles ocorrem especialmente em dois tipos de genes reguladores, antagonistas entre si: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996; MURRAY ; HUNT, 1993). É estimado que são necessárias de seis a oito alterações genéticas envolvendo esses genes para ocorrer o desenvolvimento do câncer (JORDAN; DALEY , 1997)

Os produtos dos proto-oncogenes e dos genes supressores de tumor são aqueles que, respectivamente, contribuem para estimular o crescimento ou proliferação celular, e aqueles que contribuem para sua inibição. Assim, alterações nesses dois grupos de genes podem levar as células à proliferação descontrolada.

Quando os proto-oncogenes são alterados, passam a chamar oncogenes e mutações nesse grupo de genes têm caracteristicamente um efeito dominante, isto é, somente uma das duas cópias do gene necessita sofrer mudanças (WILLIAMS, 2000).

Os produtos dos proto-oncogenes são reguladores importantes do crescimento e diferenciação de células em todos os organismos eucariotas, e regulam uma cascata de eventos que mantém a progressão ordenada do ciclo celular, divisão e diferenciação celular. Entre os principais produtos dos proto-oncogenes, podemos citar: fatores de crescimento, citocinas, receptores de fatores de crescimento, fatores de transcrição, enzimas de controle da replicação do DNA, e proteínas que sinalizam para o núcleo (LOURO, 2002). Na carcinogênese de boca, muitos oncogenes têm sido relatados (SUGERMAN; JOSEPH; SAVAGE, 1995), como os genes: c-ras, EGF, FGF, WNT, (EVAN et al., 1994; SABBAGA, 2000)

De maneira inversa ao que ocorre com os oncogenes, alterações nos genes supressores de tumor tornam sua propriedade inibitória inativa. Este tipo de mutação apresenta um caráter recessivo, sendo que ambas as cópias do gene precisam estar inativas ou deletadas para liberar a célula da inibição (ALBERTS et al., 1997).

Genes supressores de tumor vem sendo associados ao carcinoma de boca, dentre eles: DCC (“deleted in colon cancer”) (KIM et al., 1993), APC (“adenomatous polyposis coli”) (LARGEY et al., 1994) TGF- β (fator de crescimento tumoral, isoforma β) (PARTRIDGE et al., 1989) pRb (proteína do retinoblastoma), PTEN (SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JR, 2002), mas a função específica de cada gene ainda permanece incerta.

A despeito dos esforços e altos investimentos na busca de marcadores biológicos, há muito a ser descoberto, e o que ainda se tem de concreto e de fácil

acesso a clínicos e pesquisadores, para sugerir prognósticos em oncologia de cabeça e pescoço são os aspectos clínicos e histopatológicos das lesões. Portanto, o conhecimento da patologia (macro e microscópica), com suas diversas apresentações clínicas e suas conseqüentes implicações no curso da doença é essencial para os profissionais de saúde que se dedicam à prevenção, detecção precoce e tratamento do câncer de cabeça e pescoço, em especial do carcinoma epidermóide de boca (ALMEIDA et al., 2004).

2.2 Fatores Prognósticos

2.2.1 Classificação TNM

A padronização de informação é fundamental para possibilitar troca de informações e experiências, proporcionando estabelecer protocolos aplicáveis à determinados grupos de pacientes. Com este intuito, em 1954, a União Internacional Contra o Câncer (UICC), após uma inicial e bem sucedida experiência em 1938, do desenvolvimento de um Atlas sobre câncer uterino, propôs a criação de uma publicação que contemplasse outros tipos de tumor. O Atlas TNM está atualmente na sua quinta edição, publicada em 1992 e traduzida para o português pela Fundação Oncocentro de São Paulo, em 1997.

A sigla TNM significa T (tumor), N (nódulo regional) e M (metástase a distância). Portanto, a classificação da UICC leva em conta, basicamente, dimensão

e relação do tumor e metástases com tecidos adjacentes. O Quadro 2.1, retirado do Atlas da UICC, resume como aplicar a classificação no que diz respeito ao câncer de boca.

Classificação T, N e M dos tumores malignos da boca de acordo com a UICC e o AJCC (aplicável somente no carcinoma epidermóide)	
T	Tumor primário
T X	Tumor primário não pode ser avaliado
T 0	Tumor primário não evidente
T is	Carcinoma <i>in situ</i>
T 1	Tumor com <u>2cm ou menos</u> em sua maior dimensão
T 2	Tumor com <u>mais de 2cm e até 4cm</u> em sua maior dimensão
T 3	Tumor com <u>mais de 4cm</u> em sua maior dimensão
T 4	Tumor <u>invade estruturas adjacentes</u> (mandíbula, maxila, musculatura, etc.)
N	Linfonodos regionais
N X	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N 0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N 1	Metástase em único linfonodo ipsilateral ao primário com 3cm ou menos em sua maior dimensão
N 2	N 2a: Metástase em único linfonodo ipsilateral ao primário com mais de 3cm e até 6cm em sua maior dimensão N 2b: Metástases em linfonodos ipsilaterais ao primário, onde nenhum tenha mais de 6cm em sua maior extensão N 2c: Metástases em linfonodos bilaterais ou em linfonodo(s) contralateral(is), onde nenhum ultrapasse 6cm em sua maior extensão
N 3	Metástase em linfonodo(s) regional(is) com mais de 6cm em sua maior extensão
M	Metástases à distância
M X	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M 0	Ausência de metástases à distância
M 1	Presença de metástases à distância

Quadro 2.1 – Classificação TNM/UICC

A classificação é muito feliz quando considera, além das dimensões, a invasão de estruturas próximas. A nota T4 é estabelecida quando o tumor de qualquer dimensão não respeita estruturas adjacentes. Assim sendo, uma lesão de trigono retromolar que invada periósteo já é um tumor avançado e vai ser incluído entre os objetos de terapêuticas agressivas, como um T4 exige. Por outro lado, tumores até 2 cm, e portanto T1, independente de outros fatores, tem um comportamento biológico mais favorável. Cerca de 90% desses casos tem sobrevida livre de doença de mais de cinco anos.

O comprometimento de linfonodos regionais (N) é um importante fator de franco impacto prognóstico (SHINGAKI et al., 2002). Os serviços de cirurgia de cabeça e pescoço apontam uma incidência de metástases cervicais que varia de 25 a 65%. No Hospital das Clínicas de São Paulo aproximadamente de 60% dos doentes é N0 (DURAZZO; SILVA FILHO, 1997). A sobrevida global em pacientes N+ cai de 60-70% para 30-50% em relação aos pacientes N0 (dados não publicados). Entretanto, a presença ou não de linfonodo comprometido não é o único fator que deve ser observado. A invasão extracapsular, por exemplo, tem sido apontada como importante fator prognóstico. A literatura relata um decréscimo na sobrevida desses doentes de cerca de 10% e múltiplos linfonodos comprometidos também diminuem a sobrevida em cerca de 50% em relação aos pacientes com apenas um linfonodo doente (KOKEMUELLER et al., 2002). A localização das metástases aparentemente tem importância, ainda que menor. Finalmente, os estudos revelaram um ganho na sobrevida dos pacientes submetidos a radio e quimioterapia pós-operatória, em relação à radioterapia exclusiva (MOHR et al., 1990).

É importante destacar que a doença locorregional no carcinoma epidermóide de boca é fator prognóstico importante e suas particularidades devem ser estudadas com amostras maiores e estudos randomizados. A investigação do pescoço é fundamental para guiar o tratamento e planejar a reabilitação do doente, à medida que sempre devemos vislumbrar a sobrevida global de nosso paciente (ALMEIDA et al., 2004; DURAZZO et al., 2001).

As metástases à distância são mais raras, em relação às regionais. Cerca de 1% dos pacientes do serviço da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP apresentam doença à distância. A classificação M1, já indica que a doença é avançada, sem levar e conta

o T ou N. O sítio preferencial das metástases é o pulmão, seguido de osso e cérebro. O M1, normalmente, no caso do CE de boca, torna a doença incurável e o paciente fora de possibilidades terapêuticas (LEON et al., 2000).

A classificação TNM é utilizada por clínicos e pesquisadores e tem sido uma importante ferramenta na padronização da informação. Entretanto, críticas à classificação são enumeradas, tendo em vista que não são contemplados itens tais como: espessura do tumor, grau histológico, invasão perineural e vascular, sub-regiões comprometidas, ulceração de pele, dentre outros. Sem dúvida, a cada item incorporado à classificação, sua utilização vai tornando - se mais complexa e o custo benefício dessas alterações deve ser avaliado e ponderado (ALMEIDA et al., 2004 a).

2.2.2 Idade

Para estabelecer a idade como fator prognóstico, há que se observar o curso da doença nos grupos de pacientes que desenvolvem câncer de boca e encontram-se fora do padrão esperado. O primeiro grupo é o de pacientes jovens. São controversos os artigos da literatura que relatam a progressão do câncer de boca em pacientes jovens, provavelmente porque as amostras são pequenas e diversas, no que tange outros fatores, que serão melhor explorados a seguir (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001) . Entretanto, impõe-se olhar para este grupo com muita atenção, à medida que aparentemente o câncer de boca neste grupo, difere dos pacientes freqüentemente acometidos pela doença, já

que muitos desses doentes não se expõem ao tabagismo e etilismo e, portanto, deve haver outros mecanismos de carcinogênese agindo nesses doentes (FEDELE; JONES; NIESSEN, 1991; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001; MASHBERG, 1993; MASHBERG; SAMIT, 1995)

Alguns autores relatam que o grupo de pacientes com menos de 40 anos de idade apresentam um decréscimo na sobrevida (CIANFRIGLIA; DI GREGORIO; MANIERI, 1999), mas é importante considerar com cautela esses dados, pois as amostras são muito pequenas e muitos dos casos são de tumores de língua, sabidamente de prognóstico pior apenas por sua localização (STRONG, 1979).

Por outro lado, Clark, Rosen e Laperriere (1982), observaram um melhor prognóstico, com ganho de sobrevida em pacientes com menos de 30 anos de idade, e ainda, outros afirmam que o curso da doença em ambos os grupos são comparáveis e a sobrevida semelhante (MC GREGOR; RENNIE 1987).

Uma leitura crítica desses artigos deve ser realizada, pois muitos deles não levam em conta a terapêutica empregada e a presença dos fatores de risco, tais como o consumo de álcool e tabaco. Entretanto, algumas observações são muito importantes. Kuriakose et al. (1992), afirmam que pacientes jovens que desenvolvem câncer de boca sem apresentarem histórico de utilização de álcool e tabaco apresentam uma sobrevida menor. Os mesmos autores apontam que esses doentes apresentam lesões predominantemente infiltrativas em relação às apresentações mais exofíticas das lesões em pacientes com mais de 60 anos. Tsukuda et al. (1993) afirmam que pacientes jovens apresentam tumores com pouca diferenciação histológica, sendo esse fato, por si só, fator de impacto negativo no prognóstico. Tendo em vista o surgimento precoce do câncer de boca sem associação aos fatores de risco, a literatura sugere que esses doentes devem apresentar uma

predisposição genética importante, com falhas em mecanismos de reparo de DNA, mutações em genes supressores de tumor e oncogenes que conferem um decréscimo na sobrevida e ou suscetibilidade ao desenvolvimento da doença (TSUKUDA et al., 1993). O entendimento e estudos mais profundos com utilização de técnicas como biologia molecular e celular são importantes para esclarecer as dúvidas ainda existentes e provavelmente, esses achados possam colaborar, inclusive, para o entendimento do câncer de boca nos grupos de diferentes riscos.

2.2.3 Localização

A localização do carcinoma epidermóide de boca, por si só, dita a agressividade e extensão do tratamento cirúrgico e dos limites das terapêuticas adjuvantes, tais como radioterapia e abordagem cirúrgica profilática das estruturas cervicais. A proximidade com vasos calibrosos, o arranjo histológico dos tecidos e a presença de anastomoses vasculares e linfáticas são fatores que podem explicar a relação da localização e o comportamento biológico da doença (MONTENEGRO et al., 1998; SUWINSKI et al., 2003).

Os tumores de língua e soalho, por exemplo, merecem atenção e tratamento usualmente agressivo. A língua é uma estrutura muscular complexa, constituída de vasos calibrosos e que se anastomosam possibilitando a disseminação bilateral da lesão. Também as vias de drenagem linfática, por vezes cruzam esta linha, de modo que em lesões que aparentemente respeitem a linha mediana, a disseminação para os linfonodos contralaterais do pescoço pode ser observada (MASHBERG; SAMIT,

1995). O soalho bucal, no entanto, localiza-se próximo a planos musculares, assim como à mandíbula. A simples infiltração do periósteo pelo tumor requer terapêutica mais agressiva, com eventual remoção de segmentos do osso (PETRUZZELLI et al., 2003; SHINGAKI et al., 2002). A reconstrução cirúrgica dessa região, tanto muscular quanto óssea, é um capítulo à parte, mas vale ressaltar que muitas vezes a equipe oncológica lança mão de retalhos e enxertos microcirúrgicos, aumentando o porte da cirurgia e seu custo, além de dificultar, e até mesmo, impedir a reabilitação protética desses doentes. Os tumores localizados próximos a ossos, como os de soalho, merecem planejamento diferenciado dos campos de irradiação, pois a dose próxima ao osso é menor, de modo a evitar a osteorradionecrose da região (SHINGAKI et al., 2002). Contrapondo-se aos tumores de língua e soalho, os tumores de mucosa jugal, por exemplo, parecem ter um comportamento biológico menos agressivo (MISHRA et al., 1999).

2.2.4 Espessura

A observação clínica da evolução do carcinoma epidermóide de boca tem levado a uma profunda discussão sobre quais os parâmetros clínicos que poderiam ser utilizados para indicar prognóstico. Recentemente a espessura do tumor foi apontada, para alguns sítios específicos, como sendo um importante fator prognóstico, do ponto de vista clínico (KARAKIDA et al., 2002; O'BRIEN et al., 2003).

Na Índia, país que possui uma alta incidência de câncer de boca na região do sulco gengivo-jugal, devido aos hábitos locais, observou-se ter sido a espessura o único parâmetro que foi relevante na observação de recorrência e metástases regionais (BORGES; SHRIKHANDE; GANESH, 1989).

Aparentemente a espessura do tumor parece ser mais relevante em tumores precoces T1 – T3, entretanto, a despeito dos exames de imagem não indicarem, boa parte dos pacientes com tumores mais espessos, já têm micrometástases (YAMAZAKI et al., 2004). A classificação de T1 a T3 leva em conta somente as dimensões da lesão, ao contrário da classificação T4, que já considera o comprometimento dos tecidos adjacentes. Portanto, em lesões restritas aos seus sítios de origens, a classificação TNM está sendo discutida e a espessura do tumor tem sido considerada importante para indicar ou não o esvaziamento cervical profilático e/ou radioterapia, ou seja, têm na prática clínica influenciado decisões terapêuticas (KARAKIDA et al., 2002).

2.3 Genes WNT

Em Nusse e Varmus (1982) clonaram do genoma de rato o primeiro gene *wnt* e naquela época, aqueles pesquisadores suspeitaram ter identificado um protooncogene. Os experimentos prosseguiram e outros autores, na mesma década, relacionaram a expressão gênica de membros da família *wnt* em organismos superiores (MCMAHON; MOON, 1989). Os artigos da década de 80 são confusos, as metodologias eram limitadas, mas o fato é que os WNT já surgiam no cenário da

pesquisa como importantes na sinalização para desenvolvimento normal e já se especulava possíveis relações entre sua desregulação e a carcinogênese.

Nusse e Varmus (1992) publicaram a revisão mais clássica sobre essa família e, surpreendentemente, sem contar com toda a metodologia e conhecimento que dispomos hoje em dia, eles já especulavam sobre pontos que seriam desvendados e comprovados anos depois. Através da técnica de PCR, os autores afirmaram que a família WNT estava conservada durante a evolução, à medida que a identificaram desde organismos inferiores até o ser humano.

Nusse e equipe serão citados durante todo o texto, tendo em vista que para estudar-se os WNT, necessariamente, deve-se consultar e estudar o que esta genial equipe, que há mais de 20 anos se dedica ao estudo da WNT, tem a compartilhar. A equipe de Nusse disponibiliza um site para consultas, “download” de artigos e fotos e é uma base importante de pesquisa: <http://www.santord.edu/~rnusse>.

Em 1992, o WNT2 foi identificado super-expresso em tumores de mama de ratos, (ROELINK et al., 1992), reforçando os achados de Nusse e Varmus e Nusse et al. (1982, 1991).

Hoje em dia sabe-se que as WNTs são glicoproteínas secretadas que consistem de 350 a 400 aminoácidos, compondo uma família de 20 genes (NUSSE, 2001; UUSITALO; HEIKKILA; VAINIO, 1999). Essas moléculas se ligam ao receptor transmembrana Frizzled e ao co-receptor Dally, mediando assim vias de transdução de sinal, o que resulta em alterações na expressão de genes, no comportamento celular, na adesão e na polaridade das Células (HUELSKEN; BEHRENS, 2002; MOON; SHAH, 2002). Estudos revelam que a via de sinalização do WNT inclui vários componentes, tanto no citoplasma como no espaço extracelular. Na verdade, os membros da família Wnt têm sido divididos em duas classes funcionais com base

em suas atividades biológicas. Algumas WNTs sinalizam pela via Wnt-1/wingless, dita clássica ou canônica, que estabiliza a β -catenina citoplasmática. Outras estimulam a liberação de Ca^{++} intracelular e ativam duas cinases, CamKII e PKC, de maneira dependente de proteínas G (KUHL et al., 2001). Quando as WNTs são secretadas, elas podem se acumular na célula alvo (efeito parácrino) ou na célula secretora (efeito autócrino), esta característica marca de forma profunda e definitiva a família WNT e revela a regulação fina e precisa dessas moléculas. A figura 2.1 ilustra a posição do gene no genoma.

Figura 2.1 – Localização do gene WNT5A no genoma humano

Fonte figuras: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/mapview?

2.3.1 Vias de sinalização

O estudo da família WNT revelou que há mais de uma via de sinalização utilizada por diferentes membros dessa família, uma delas, denominada via clássica ou canônica, por ser a primeira a ser descrita, e outra, não canônica posteriormente publicada.

A via canônica, por ser antes descrita, é também mais profundamente conhecida, sendo assim, o papel do WNT como regulador da proteína β -catenina citoplasmática foi demonstrado por diversos autores e mostrou-se crucial para regulação dos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares (MIGUEL; AMORIM, 2004; PEIFER; POLAKIS, 2000), mais tarde observou-se que os WNTs desempenhavam importantes papéis durante a embriogênese e tumorigênese. Um exemplo de gene que compoe esta via, o WNT1 é o que caracteriza este grupo.

As proteínas WNTs possuem receptores específicos de membrana denominados Frizzled (Fzd), toda a sinalização inicia-se pela ligação WNT e seus Frizzled. A sinalização do WNT desencadeia uma série de respostas dependentes, ou não, da β -catenina, como proliferação celular, remodelação do citoesqueleto, dentre outras (KUHNERT et al., 2004; NELSON; NUSSE, 2004).

A via não canônica possui um número bem inferior de publicações e muito mais perguntas a serem respondidas, o fato é que esta via não depende da β -catenina e sim dos níveis extra celulares de CA^{2+} (HOANG et al., 2004). Há relatos de interação entre as vias e um possível papel antagônico entre elas (TAKI et al., 2003).

2.3.2 O gene WNT5A

O gene WNT5A, membro da família WNT e representante da via não canônica dependente de cálcio, é caracterizado como antagonico da via da β -catenina, estando presente em diversos tecidos normais e patológicos. No câncer, são inúmeras as pesquisas relacionando alterações na expressão desse gene (NUSSE; VARMUS, 1982; WEERARATNA et al., 2002). Em células imortalizadas de câncer de mama de ratos, células com elevada expressão de WNT1 (via canônica) exibiam diminuição na expressão do gene Wnt5a (OLSON; GIBO, 1998), os autores demonstram que o aumento na expressão do WNT5A antagonizou a via do WNT1 e bloqueou o processo de tumorigênese. Os mesmos autores, em estudo anterior, super expressaram o Wnt1 em células de mama de ratos e causaram nas transformação maligna e diminuição dos níveis de Wnt5a nessas células (OLSON; PAPKOFF, 1994). Outros estudos do mesmo grupo corroboram com a teoria de que o gene WNT5A estaria relacionado com a “parada” do processo de carcinogênese. Olson e Gibo (1998) verificaram que o bloqueio do Wnt5a em células de câncer do trato urogenital devolviam um fenótipo semelhante ao normal para essas células. Por outro lado, estudos utilizando a metodologia de antisense para o gene Wnt5a revelaram que essas células apresentavam uma diminuição da adesão em estudos de motilidade celular e, portanto esse gene poderia estar relacionado com o potencial de invasão local e à distância do câncer (DI MILLA; BARBEE; LAUFFENBURGER, 1991).

Prosseguindo na análise da literatura, observamos que há tumores que apresentam uma super expressão do gene WNT5A e outros que apresentam uma

diminuição da expressão. Em tumores de pulmão, mama e próstata, o gene WNT5A está mais expresso em comparação com tecido normal (IOZZO; EICHSTETTER; DANIELSON, 1995 e LEJEUNE et al., 1995). Lejeune no mesmo trabalho de 1995 afirma ter verificado o transcrito do WNT5A através de hibridização “in situ” no componente epitelial da neoplasia de mama. Em tumores de pâncreas há relatos de diminuição da expressão desse gene (CRONOGORAC-JURCEVIC et al., 2001).

Uma característica importante do gene WNT5A é sua relação com adesão e motilidade celular. Weeraratna et al. (2002), publicaram um estudo, importante sobre as diversas variáveis relacionadas ao papel do WNT5A nas características fenotípicas do melanoma cutâneo e concluíram que o Frizzled 5 (Fzd-5), receptor de membrana do WNT5A desempenha papel fundamental, à medida que o aumento de WNT5A ligado ao seu Fzd, aumentou a invasão e motilidade celular, e, o bloqueio do Fzd5 por um anticorpo, inibiu atividade e invasão celular, à despeito da presença do WNT5A. Os autores discutem que o complexo WNT5A/Fzd5 deve sinalizar para invasão celular e que o WNT5A livre pode ativar ou inibir outras vias, gerando um fenótipo menos agressivo de célula. Por outro lado, o incremento apenas do WNT5A levou ao aumento da adesão e da resistência das células à processos tais como da tripsinização. Após uma série de outras análises, incluindo imunohistoquímica, os autores finalmente concluem que a expressão do WNT5A é localizada e encontra-se em áreas de invasão celular. Este estudo nos mostra a complexidade que pode haver em uma via de sinalização e que apenas a soma de resultados com diferentes métodos e levando - se em conta inúmeras variáveis pode nos levar a conclusões mais definitivas.

Outro estudo revelou que o bloqueio da expressão do WNT5A está relacionado com a diminuição da sobrevida livre de doença de pacientes portadores

de carcinoma ductal de mama e aumento do grau histológico dessa doença. (DI MILLA; BARBEE; LAUFFERBUGER, 1991). Em 2002, um grupo sueco, também estudando câncer de mama, fez observações importantes, com relação ao papel de membros da via de sinalização do WNT5A e elementos da matriz extra celular, especialmente os colágenos e as integrinas. Eles ainda afirmam que têm grande potencial as terapêuticas que busquem agonistas da via do WNT5A para pacientes portadores de carcinoma ductal de mama que não expressem esse gene. (JONSSON et al., 2002). Precedendo este trabalho, Di Milla; Barbee; Laufferbuger (1991) e Saithoh (1998), relacionaram o WNT5A na interação epitélio-mesênquima.

Em câncer de cabeça e pescoço a primeira citação feita ao WNT5A data de 2002. Estudo utilizando a metodologia de micro arranjo detectou o gene WNT5A menos expresso em nove carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço em relação aos seus tecidos normais do mesmo indivíduo (AL MOUSTAFAT et al., 2002). Em setembro do mesmo ano, Rhee et al. (2002) utilizando a metodologia de RT-PCR, observaram as expressões de membros das famílias WNT e FZD e o WNT5A estava expresso em 4 dos dez tumores de cabeça e pescoço analisados. Com base no conjunto de dados obtidos do estudo, Rhee et al. (2002) concluíram que a família WNT seria um potencial imunoterápico para câncer de cabeça e pescoço.

Em 2004, tentou-se estabelecer relação entre a expressão de dois WNTs, WNT4 e WNT5A, em células de carcinoma epidermóide humano, incluindo oito de boca. Os autores concluíram que ao contrário do que ocorre em muitos outros tipos de câncer, o WNT5A estaria super expresso em tumores menos diferenciados e mais invasivos, ao contrário do WNT4, que desempenharia papel antagônico ao WNT5A (TAKI et al., 2003). Ao contrário de achados prévios a esta dissertação em

nosso laboratório, os experimentos revelaram, em 21 casos de tecido fresco de carcinoma epidermóide de boca analisados, que há uma forte relação estatística entre a diminuição expressão do gene WNT5A e o aumento da espessura e do tamanho da lesão $p = 0,00009$ (ALMEIDA et al., 2004).

2.4 Genes homeobox

Os genes homeobox constituem uma família de genes que codificam para o desenvolvimento embrionário de muitos organismos diferentes, de plantas a vertebrados (SCOTT; GOLDSMITH, 1993). Inicialmente descritos na "mosca da fruta" *Drosophila melanogaster*, os genes homeobox regulam a ação de outros genes responsáveis pela organização e desenvolvimento dos membros e segmentos da mosca adulta (REUTER et al., 1990). Para a grande maioria dos genes descritos em *Drosophila*, foram descritos homólogos em organismos superiores (AKAM, 1989). Posteriormente foi verificado que esses genes homeóticos apresentavam como característica uma região na fita de DNA composta por 183 pares de base (pb) denominada homeobox, e que codificava uma seqüência de aminoácidos denominada homeodomínio (GEHRING; HIROMI, 1986).

O homeodomínio presente nas proteínas homeobox é uma região de 61 aminoácidos, que pode ser encontrada em diferentes espécies, de fungos, a plantas e animais (SCOTT, 1992).

O homeodomínio é uma região de ligação ao DNA capaz de reconhecer seqüências específicas, devido a sua forma estrutural composta de quatro regiões

em hélice dobradas numa estrutura globular (DESPLAN; THEIS; O' FARRELL, 1986). Sua conformação tridimensional apresenta domínio estrutural hélice-alça-hélice, exatamente igual aos motivos das proteínas reguladoras das bactérias, fato este que permitiu as primeiras indicações de função relacionada à regulação gênica (ALBERTS et al., 1997).

Os efeitos das proteínas apresentando o homeodomínio na transcrição podem ser positivos ou negativos, dependendo de um número de variáveis, incluindo o tipo celular, o sinal recebido ou emitido pela célula e a atividade de outras proteínas acessórias da transcrição (HOEY et al., 1988). Dessa forma os genes homeobox operam em muitas células de diferentes tipos de tecidos, modulando uma grande variedade de processos durante o desenvolvimento embrionário (AKAM, 1999).

Entre as evidências que sugerem um possível envolvimento dos genes homeobox com a transformação maligna, está a provável relação dos genes homeobox com as moléculas morfogenéticas, à interação entre homeobox e a cascata de sinalização ras, a associação entre o sistema homeobox com citocinas e fatores de crescimento, e uma possível relação entre os homeobox e a proteína p53 (CILLO et al., 2001).

2.4.1 Genes HOX

Os genes HOX correspondem a classe I dos genes homeobox (GEHRING; HIROMI, 1986). Em humanos, 39 membros da família HOX são organizados em 4

grupos: HOXA, HOXB, HOXC e HOXD, cada um localizado em um cromossomo, respectivamente 7, 17, 12 e 2 (ACAMPORA et al., 1989; ZHAO; POTTER, 2001).

Esses genes estão expressos durante toda a embriogênese dos mamíferos principalmente no sistema nervoso central (SIMEONE et al., 1986). Na vida adulta, alguns dos genes HOX são expressos em tecidos normais (ACAMPORA et al., 1989).

Em embriões de mamíferos, os genes HOX começam a ser expressos na gastrulação. Coletivamente controlam a identidade de várias regiões ao longo do esqueleto (GRAHAM; PAPALOPULO; KRUMLAUF, 1989). Essa ação ocorre seguindo os papéis de colinearidade temporal e espacial, com os genes na posição 3' sendo expressos mais precocemente e agindo no desenvolvimento da região anterior, seguindo-se mais tardiamente a expressão dos genes na posição 5', que controlam o desenvolvimento das regiões posteriores (CILLO et al., 1999).

Sabe-se que anormalidades nos genes HOX originam uma ampla variedade de defeitos congênitos em invertebrados e vertebrados (GAUNT et al., 1986). Estudos demonstraram que um número de ratos transgênicos, mutantes para os genes HoxA4, HoxA5 e HoxA6, uma anormalidade esquelética específica, conhecida como transformação posterior da sétima vértebra cervical. Nestes casos, a sétima vértebra desenvolve um par de costelas, formando uma estrutura que relembra a primeira vértebra torácica (ANBAZHAGAN; RAMAN, 1997), acreditam que esta malformação vista em ratos pode representar-se semelhante vista em humanos, chamada costela cervical, encontrada em 2 a 6% dos indivíduos. Segundo Schumacher, Mai e Gutjahr (1992), existem alguns tumores em crianças que estão associados com a ocorrência da costela cervical, como: neuroblastomas, tumores de cérebro, sarcomas de tecido mole, leucemias e tumor de Wilms. Nos órgãos ou

tecidos que originam os tumores citados há expressão de determinados genes HOX durante o desenvolvimento e diferenciação (SHEN et al., 1992).

2.4.2 Genes HOX e câncer

Além do seu papel importante no desenvolvimento embrionário, a atuação dos genes HOX na oncogênese vem sendo muito investigada. Foi primeiramente descrita em leucemias (LAWRENCE ; LARGMAN, 1992).

Alterações na expressão dos genes HOX também têm sido descritas em diferentes tipos de leucemias humanas (CELETTI et al., 1993). HATANO et al. (1991) encontraram expressão alterada do gene HOX11 na translocação t(10; 14) em leucemias de células T. Blatt e Sachs (1988) afirmaram que a deleção do gene *HoxD3* pode ter um papel importante no surgimento de leucemias mielóides de ratos. PERKINS et al. (1991) descreveram que os genes HOX podem ser fundamentais na diferenciação hematopoiética e consequentemente no desenvolvimento neoplásico.

Mesmo com este grande número de cânceres exibindo alteração na expressão dos genes HOX, o preciso mecanismo pelo qual estes genes levam ao desenvolvimento do câncer ainda permanece desconhecido (FORD, 1997). A maioria dos trabalhos, como os descritos a seguir, relata os seus achados de alteração do padrão de expressão de determinados genes, mas não conseguem definir como atuam. Alguns até sugerem um provável mecanismo e uma possível via de sinalização, mas nada foi confirmado até os dias de hoje.

Cillo et al. (1992) estudaram a expressão desses genes no rim normal e em carcinomas, utilizando a técnica do Northern Blot. Os autores observaram que a grande maioria dos genes HOX analisada estava expressa de forma peculiar no rim normal. Os genes HOXB1 e HOXB5 presentes no rim normal estavam ausentes nos carcinomas, enquanto que o HOXC7 não expresso no rim normal foi observado nos carcinomas. Os achados sugeriram para os autores uma associação entre a expressão alterada dos genes HOX e o carcinoma de rim.

Rieger et al. (1994) investigaram a expressão do gene HOXC4, através da técnica do PCR e da hibridização in situ, em queratinócitos normais de pele e compararam com tumores de pele, incluindo o carcinoma epidermóide. O gene HOXC4 foi encontrado nos queratinócitos normais e nas áreas bem diferenciadas do carcinoma epidermóide, sendo que áreas pouco diferenciadas foram negativas. Os autores sugerem que a perda da diferenciação é acompanhada da desregulação da expressão do gene HOXC4.

Alami et al. (1999) estudaram o padrão de expressão da classe I dos genes HOX em queratinócitos cervicais humanos normais e em queratinócitos transformados. Observaram que o padrão de expressão dos genes HOX em queratinócitos normais foi conservado, havendo, porém o aparecimento da expressão dos genes HOXC5 e HOXC8 nas células transformadas. Para os autores, a diferenciação do queratinócito dentro do epitélio pode sofrer a ação de uma combinação de expressão entre os genes HOX, e ainda sugeriram que os genes HOXC5 e HOXC8 são candidatos em potencial para participar na aquisição do fenótipo transformado pelos queratinócitos.

Já Tiberio et al. (1994) analisaram a expressão dos genes HOX em carcinomas pulmonares e em suas metástases. Os resultados mostraram que os

diferentes casos de carcinoma pulmonar de pequenas células apresentaram padrões diferentes de expressão dos genes HOX. Adicionalmente, a expressão desses genes foi substancialmente menor nas metástases do que nos tumores primários. Os autores concluíram que uma desregulação dos genes HOX pode desempenhar um papel na progressão dos carcinomas pulmonares de pequenas células, possivelmente através de mecanismos de supressão tumoral.

Bodey et al. (2000) estudaram pela imuno-histoquímica a expressão protéica dos genes HOXB3, HOXB4, e HOXC6 em tumores neuroectodérmicos e meduloblastomas de crianças. Foi observada forte marcação para o HOXB3 e HOXB4 em todos os casos. A marcação para HOXC6 foi considerada de média intensidade. Os autores sugerem novos estudos para estabelecer o papel destas proteínas na progressão de neoplasias, com vistas ao diagnóstico precoce e tratamento das inúmeras neoplasias humanas.

Waltregny et al. (2002) estudaram através de RT-PCR a expressão do gene HOXC8 em carcinomas de próstata e verificaram que a superexpressão do gene estava associada com a perda da diferenciação do tumor. Para os pesquisadores, o gene HOXC8 pode desenvolver um papel na aquisição de um fenótipo invasivo e metastático desta neoplasia.

Chariot e Castronovo (1996) utilizando a técnica RT-PCR, detectaram a expressão do gene HOXA1 em diferentes neoplasias de mama de humanos, e associaram a sua presença ao estabelecimento do fenótipo transformado nas células neoplásicas. Os autores afirmam ainda que a expressão do gene HOXA1 pode estar relacionada à progressão do câncer de mama, e que pode também ser um dos reguladores da diferenciação de células epiteliais em mama.

No câncer colorretal, Vider et al. (1997) e Vider et al. (2000) observaram que os HOX B6, B8, C8 E C9 estão superexpressos em vários estágios. Em contraste, todos os casos de câncer exibiram uma diminuição da expressão do gene Cdx1 (também da família homeobox). Os autores consideram que a diminuição da expressão do Cdx 1 é consistente com a idéia de que os genes com função na formação e preservação do epitélio intestinal, podem, quando desregulados, comprometer o controle da proliferação, diferenciação e morte celular, levando ao surgimento do câncer. Recentes estudos sugerem ainda, uma ligação regulatória entre HOXB8 e muitos genes supressores de tumor, dentre eles o DCC, APC e TGF- β , reforçando a possibilidade do gene HOX estar envolvido no câncer de cólon (VIDER et al., 1997).

2.4.3 HOXB5

O grupo HOXB está localizado no cromossomo 17p21.3 e contém 10 genes (HOXB1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 e B13). O gene HOXB5 está localizado bem no centro do cromossomo (Figura 2.2). Sua expressão tem sido demonstrada em muitos tecidos embrionários e foi o primeiro gene HOX de vertebrados clonado e encontrado em órgãos como pulmão, rins e gônadas (JACKSON; SCHOFIELD; HOGAN, 1985, KAPPEN, 1996).

Existem poucos trabalhos associando o grupo B da família HOX em câncer humano. Celetti et al. (1993) relataram que os genes encontrados nos grupos HOXA e HOXB estão envolvidos no desencadeamento da leucemia. Com relação ao gene

HOXB5, o primeiro trabalho, realizado por Cillo et al. (1992) estudaram através da técnica de “Northern Blot”, carcinomas de rim comparados a tecido renal normal e verificaram que os genes HOXB1 e HOXB5 presentes no rim normal, estavam ausentes nos carcinomas, enquanto que o HOXC7 não expresso no rim normal foi observado nos carcinomas. Os achados sugeriram para os autores uma associação entre a expressão alterada dos genes HOX e o carcinoma de rim.

Assim como os outros grupos de genes HOX, não existem relatos do gene HOXB5 em carcinomas de cabeça e pescoço.

Figuras 2.2 - Ilustrações sobre localização e distribuição do HOXB5 no genoma. (Fonte figuras: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/mapview?Chr=37 em 20 de setembro de 2004)

2.5 Relação entre os HOX e WNT

Calvo et al. (2000) estudaram a expressão dos genes HOX e do gene Wnt7A em carcinomas de pulmão através da técnica RT-PCR e verificaram que a expressão do Wnt7A diminuía em carcinomas de pulmão, quando comparadas a expressão em tecido pulmonar normal e em cultura de células epiteliais de brônquio imortalizadas. A este fato acrescentaram a perda concomitante de expressão dos genes HOXA1, HOXA7, HOXA9 E HOXA10 em carcinomas de pulmão. Os autores sugeriram que uma alteração envolvendo os circuitos regulatórios dos genes HOX e Wnt pode ocorrer freqüentemente em carcinomas de pulmão.

3 PROPOSIÇÃO

- 3.1 Verificar a expressão de transcritos dos genes WNT5A e HOXB5 em carcinomas epidermóides de boca e comparar tais expressões com tecido epitelial livre de neoplasia do mesmo indivíduo.

- 3.2 Relacionar as populações celulares marcadas com as características histológicas da neoplasia em estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Com o término do Projeto Genoma Câncer desenvolvido pelo Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer e com o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), seu banco de dados tornou-se fonte para pesquisadores de todo o mundo. Nosso grupo, em 2002, foi à busca de genes de desenvolvimento, expressos em tumores de cabeça e pescoço. Estes genes, porém, foram detectados em RNAs extraídos de grupos de tumores de cabeça e pescoço, de diferentes localizações e de origens teciduais diversas, desta forma, não se podia afirmar quais deles estariam expressos em carcinoma epidermóide de boca. Portanto cerca de 20 genes foram separados para análise do transcrito no Laboratório de Patologia Molecular da FOUSP com parceria da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP e fomento da FAPESP (projeto nº 01/13644-6). Desses genes o WNT5A e HOXB5 foram analisados nessa dissertação de mestrado Processo 02/11220-7. Vale ressaltar que não é objetivo desta dissertação buscar relação entre os genes, que foram analisados em separado, buscando estabelecer suas possíveis relações com o carcinoma epidermóide de boca.

4.1 Parecer Comitê de Ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), ANEXO A.

4.2 Obtenção dos espécimes

Cinqüenta e quatro pacientes consecutivos, diagnosticados clínica e histologicamente como portadores de carcinoma epidermóide de boca, tiveram separados, imediatamente após a remoção cirúrgica, fragmentos da porção interna de suas neoplasias e de tecido livre de neoplasia adjacente ao tumor, após confirmação de margens livres pelo Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas. Os fragmentos foram removidos de forma a não comprometer a análise histológica. Esse material foi obtido e processado inicialmente pelos cirurgiões e docentes da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.3 Seguimento Clínico dos Pacientes

Os dois médicos responsáveis pela fase clínica do projeto descreveram periodicamente os dados de acompanhamento e seguimento dos pacientes, como evolução clínica, estadiamento e características histopatológicas, entre outros aspectos, que foram utilizados juntamente com os achados moleculares. A consulta aos prontuários do HCFMUSP e o seguimento dos pacientes, seguiram normas do Hospital das Clínicas da FMUSP. A Tabela 4.1 qualifica a amostra utilizada.

No	Vivo	RDT	QT	Fumo	Álcool	Idade	Sexo	Cor	Local	Difer.	UICC	TNM	Tamanho (cm)	Espes. (cm)	Invasão vascular	Invasão neural
12	VLD	+	+	-	-	55	F	B	bord. ling	BD	III	T2N1M0	2,3	0,7	-	+
14	VLD	+	+	+(4 ^a)	+	55	F	B	base. ling	MD	IV	PT2PN2M0	3	1	-	+
16	VLD	+	+	+	+	50	M	B	bord. ling	MD	III	PT2N1M0	4	1,2	-	+
17	VLD	+	+	+	+	70	F	B	bord. ling	MD	IV	PT1N2AMO	0,9	0,3	-	-
18	MPD	+	+	nc	Nc	87	M	P	maxila	MD	IV	T4N0M0	5,3	2	-	-
19	MPD	-	-	-	-	77	M	B	labio inf	MD	IV	T4N0M0	3,5	1,2	-	-
20	VLD	+	+	+	+	60	M	B	soalho	MD	IV	T4N3M0	7	4	+	+
21	VLD	-	-	-	-	68	M	B	labio inf	BD	II	PT2N0M0	2,5	1,3	-	-
23	VLD	-	-	-	-	69	F	B	bord. ling	BD	II	T2N0M0	2,3	0,2	NC	NC
24	VLD	-	-	+	-	78	F	B	bord. ling	BD	I	T1N0M0	NC	0,2	-	-
25	VLD	+	nc	+	+	50	M	B	mento	BD	IV	T4N0M0	3,2	0,9	-	+
26	VLD	+	-	-	-	50	M	B	língua	BD	I	T1N0M0	1,5	0,6	-	-
27	VLD	+	+	-	-	25	F	B	língua	MD	IV	T4NECMO	3,5	2	-	+
29	VLD	+	+	-	+	56	F	B	base. ling	MD	IV	T4N0M0	1,3	1,1	-	+
31	VLD					50	M	B	soalho	NC	I	T1N1M0	NC	NC	-	-
32	MOC	+	+	+	+	58	M	NC	soalho/ lin	MD	IV	T4N2BMO	4,5	3,5	-	+
33	ps	+	-	+	+	67	M	NC	língua	MD	II	PT2N0M0	2,5	2,2	-	+
34	ps			-	-	80	M	NC	língua	MD	IV	T4N0M0	3,7	1,2	-	-
35	ps			-	-	58	M	B	reb. inf.	NC	II	T2N0M0	1,7	0,7	+	+
36	ps			+	-	49	F	B	ling base	IND	IV	T4N3M0	3,7	1,8	NC	NC
37	MPD	+	+	-	-	19	M	B	língua	MD	IV	T4N2M0	NC	NC	NC	NC
38	ps	-	-	+	+	70	M	NC	lab inf	NC	NC	NC	3	NC	NC	NC
40	VLD	-	-	-	-	38	F	A	língua	BD	II	T2N0M0	1,4	0,6	-	-
41	VLD	+	+	+	+	62	M	B	lin.bord	MD	IV	T4NXMO	9	1,2	-	+
42	p	-	-	-	-	40	F	B	língua	NC	NC	NC	7	0,2	NC	NC
43	MPD	+	+	-	-	17	F	B	trig	NC	IV	T4N0M0	NC	NC	NC	NC
44	VLD			+	+	70	M	B	língua	BD	II	PT2N0M0	1,3	0,4	-	-
45	MPD	+	+	+	+	50	M	B	língua	Ind	IV	T4N1M0	1,0	1,5	NC	NC
46	VLD	+	+	+	+	47	M	B	ling bor	NC	IV	T3N2	5	NC	-	+

Legenda: VLD = vivo livre de doença; MPD = morto por doença; MOC = morto por outra causa; “+” positivo; “-” negativo; M = masculino; F = feminino; IND = pouco diferenciado; MOD = moderadamente diferenciado; BD = bem diferenciado; NC = não construa; ps = perda de seguimento;

Tabela 4.1 – Dados clínicos e histopatológicos dos casos estudados

4.4 Obtenção do RNA

Foram obtidos RNA total de parte dos tumores (TU) e tecido normal adjacente de cada paciente (TN), utilizando-se TRIzol[®] segundo orientações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Os tecidos removidos cirurgicamente foram acondicionados em tubos de 1,5ml e transportados em gelo seco até a Faculdade de Odontologia onde foram armazenado em freezer – 80°C. Os tecidos foram transferidos para um almofariz contendo nitrogênio líquido, e triturados até a obtenção de um pó. A este pó foi adicionada solução de TRIzol[®], na proporção 1 ml para cada 50mg de tecido, e, após homogenização, o material foi transferido para tubos de 1,5ml, permanecendo no gelo por 5 minutos e posteriormente à temperatura ambiente por 3 minutos. Para cada 1ml de TRIzol[®] utilizado, foram adicionados 200 µl de clorofórmio e, após centrifugação a 12.500 rpm a 4°C por 15 minutos, a fase aquosa foi transferida para novo tubo, no qual 500 µl de isopropanol foram acrescentados. As fases fenólica e protéica foram então armazenadas para utilização em posteriores trabalhos. Após acondicionamento em gelo seco por 2 horas, procedeu-se nova centrifugação, os sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado em álcool 75%. Após secagem relativa do precipitado de RNA em temperatura de 37°C, este foi dissolvido, dependendo de seu tamanho, em 25 a 50 µl de água destilada deionizada estéril, tratada com Dietil-pirocarbonato (DEPC). A quantificação do material obtido foi feita em espectrofotômetro, e a integridade do RNA verificada em gel de agarose a 1% com 18 ml de formol e 62,5 ml de tampão de corrida. A integridade foi considerada ótima quando as bandas 28S e 18S de rRNA estavam nítidas e intensas, numa razão aproximada de 2:1 (Figura 4.1). Na

espectrofotometria foi obtida uma leitura de absorbância O.D. 260/280 entre 1,8 e 2,0. Todos os procedimentos acima, bem como descritos a seguir, foram efetuados em condições livres de RNase.

Legenda – pb = pares de bases

Figura 4.1 - Exemplo de gel de integridade

4.5 RT- PCR

O RNA extraído pela técnica supramencionada foi submetido a tratamento com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, EUA), antes da sua transcrição reversa segundo instruções do fabricante (RT-PCR, Reverse transcriptase polymerase chain reaction, Invitrogen). Brevemente, ao RNA tratado com 2 U de DNase I (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foram adicionados 2 µl de oligo (dT) (Invitrogen) e água miliQ (destilada e deionizada) para completar 20 µl. Os tubos foram aquecidos a 70°C, resfriados rapidamente, e então cada tubo recebeu tampão apropriado, DTT e dNTPs (“deoxynucleoside triphosphate”) ambos fabricados pela Invitrogen. Os tubos permaneceram no termociclador por 10 minutos à temperatura de 25°C, sendo então aquecidos durante 2 minutos a 42°C. A cada tubo foi adicionado 0,5 µl da enzima Super Script II[®] (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e então mantidos a 42°C por 50 minutos. A reação foi finalizada a 70°C por 15 minutos com o intuito de neutralizar a

enzima. Quatro a cinco tubos foram sintetizados para cada amostra, para que os 20 genes do projeto FAPESP fossem testados e amplificados nas mesmas amostras, quando possível. Os cDNAs obtidos foram armazenados em freezer a -20°C até o uso.

Os procedimentos descritos até o momento não diferem, no que diz respeito aos genes estudados. Abaixo destacaremos, inicialmente, os procedimentos para o gene da β -actina, utilizado como controle positivo, que foi amplificado em todas as amostras para atestar a reatividade das mesmas. Após confirmação da qualidade dos cDNAs, os genes WNT5A e HOXB5 foram amplificados por PCR, como descrito a seguir.

4.6 PCR

4.6.1 β - actina

O gene eleito para controle da qualidade dos cDNAs foi a β -actina, que foi amplificado pela técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), utilizando-se um par de iniciadores específicos para parte da sequência dos genes (Quadro 4.1) e desenhados com base nas seqüências obtidas do GeneBank (no acesso: BC_016045). Para cada reação de amplificação, os seguintes reagentes foram

adicionados a um tubo de 0,5ml: 0,5 μ de cDNA, iniciadores senso e anti-senso, dNTPs (Invitrogen), tampão para PCR (Invitrogen), enzima Taq polimerase (Invitrogen) e água miliQ autoclavada. O equipamento utilizado foi o termociclador Master cycle² (Eppendorf², Inc). Cada reação de amplificação foi realizada com o uso de soluções “mix” para padronizar a pipetagem. Os tubos foram submetidos às seguintes condições de ciclagem: pré-denaturação a 94°C, 28 ciclos de desnaturação a 94°C, associação a 57°C e extensão a 72°C por 2 minutos, com um ciclo adicional de extensão final a 72°C para finalizar a reação.

O resultado da reação foi avaliado em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Carlsbad, EUA), contendo brometo de etídio (Invitrogen) e visualizado sob luz UV. O resultado em gel foi documentado fotograficamente com câmara Polaroid[®]. Os produtos das reações de PCR foram enviados para seqüenciamento no Instituto de Biociências da USP (Cromatograma, Anexo B).

Iniciadores	Seqüência 5' – 3'	Produto
β -actina F	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	457pb
β -actina R	GGAGCAATGATCTTGATCTTC	-----

Quadro 4.1 - Relação dos iniciadores da β -actina, com seqüência e tamanho do produto

4.6.2 WNT5A

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando-se um par de iniciadores (ou “primers”) específico para parte da seqüência do WNT5A em estudo (Quadro 4.2). Para cada reação de amplificação, os seguintes reagentes foram adicionados a um tubo de 0,5ml: 0,5 μ de cDNA, iniciadores senso e anti-senso, dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, EUA), tampão para PCR (Invitrogen, Carlsbad, EUA), enzima Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e água miliQ autoclavada. O equipamento utilizado foi o termociclador PTC-100 Peltier-Effect Cycling[?] (MJ Research[?], Inc). Cada reação de amplificação foi realizada em duplicata, e com o uso de soluções “mix” para padronizar a pipetagem. Os tubos foram submetidos às seguintes condições de ciclagem: pré-denaturação a 94°C, 28 ciclos de denaturação a 94°C, associação (ou “annealing”) a 57°C e extensão a 72°C por 2 minutos, com um ciclo adicional de extensão final a 72°C para finalizar a reação.

O resultado da reação foi avaliado em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Carlsbad, EUA), contendo brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e visualizado sob luz UV. O resultado em gel foi documentado fotograficamente com câmara Polaroid[®]. Os produtos de amplificação do tamanho esperado foram enviados para seqüenciamento pela empresa Labtrade do Brasil[?] Ltda e cromatograma ilustra o resultado (Anexo C).

Iniciadores	Seqüência 5' – 3'	Produto
WNT5A F	GGA GAA GGC GCG AAG ACA G	381 bp
WNT5A R	GGG CGT CCA CGA ACT CCT T	-----

Quadro 4.2 - Relação dos iniciadores utilizados, com seqüência e tamanho do produto
4.6.3 HOXB5

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando-se iniciadores específicos para parte da seqüência do gene em estudo, (Quadro 4.3). O planejamento desses primers contou com auxílio da Prof. Dra. Nancy Rebouças, docente do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que cedeu a estrutura de seu laboratório e seus programas de computador para que pudéssemos viabilizar a construção dos iniciadores desse gene que possui alta similaridade com outros genes HOX e diversos “gaps” que inviabilizariam a reação de PCR e principalmente a Hibridização “in situ”. Para cada reação de amplificação, os seguintes reagentes foram adicionados a um tubo de 0,5ml: 0,5µ de cDNA, iniciadores senso e anti-senso, dNTPs (Invitrogen), tampão para PCR (Invitrogen, Carlsbad, EUA), enzima Taq polimerase (Invitrogen) e água miliQ autoclavada. O equipamento utilizado foi o termociclador PTC-100 Peltier-Effect Cycling[?] (MJ Research[?], Inc). Cada reação de amplificação foi realizada em duplicata, e com o uso de soluções “mix” com o intuito de padronizar a pipetagem. Os tubos foram submetidos às seguintes condições de ciclagem: pré-denaturação a 94°C, 30 ciclos de denaturação a 94°C, associação (“annealing”) a 50 °C e extensão a 72°C por 2 minutos, com um ciclo adicional de extensão final a 72°C para finalizar a reação. O resultado da reação foi avaliado em

gel de agarose a 1% (Invitrogen, Carlsbad, EUA), contendo brometo de etídio e visualizado sob luz UV. O resultado em gel foi documentado fotograficamente com câmara Polaroid[?]. O produto de PCR foi purificado pelo Kit Exo Sap[?] (Amershan[?]) e seqüenciado no Instituto de Biociências da USP (Anexo D).

Iniciadores	Seqüência 5' – 3'	Produto
HOXB5 F	TCC TTC TCG GGG CGT TAT C	-----
HOXB5 R	AGG GTC TGG TAG CGG GTA T	599 bp

Quadro 4.3 - Relação dos iniciadores utilizados, com seqüência e tamanho do produto

4.7 Subclonagem

Os três genes foram submetidos ao mesmo procedimento de subclonagem, ou seja, a transposição de seqüências de cDNA em um plasmídeo. Parte da seqüência dos genes β -actina, WNT5A, e HOXB5 amplificadas por PCR (respectivamente 481pb, 381pb e 650 pb, tabelas 3-5). Foi utilizado o vetor TOPO TA pCR 2.1[?] (Invitrogen). Um micro-litro de cada produto de PCR, de banda única e discreta no gel de agarose, foi adicionado a um tubo de 500 μ l contendo 1 μ l do vetor, 1 μ l de solução salina oferecida pelo “Kit” e 3 μ l de água miliQ estéril. A solução foi gentilmente misturada e mantida em gelo por 5 minutos. A transformação foi realizada imediatamente após a subclonagem.

4.8 Transformação do Plasmídeo

De forma resumida para os três genes, 30 µl das células *E. coli* fornecidas com o “kit” e denominada “One Shot[®]” (Invitrogen), ficaram incubadas em gelo por 30 minutos com 1 µl do vetor contendo com os insertos, e a seguir sofreram aquecimento rápido a 42°C por 30 segundos em banho-maria e posterior transferência para gelo por mais 2 minutos, quando então foram adicionados 0,9 ml de meio SOC com MgCl₂ e incubado sob vigorosa agitação (250rpm) a 37°C por 1 hora. Usando técnica estéril, 10 a 100 µl da solução plasmídeo-bactéria foram transferidos para placas de agarose com ampicilina na concentração de 50 µg/ml que ficaram incubadas durante toda a noite a 37°C. De cinco à dez colônias bacterianas foram removidas da placa e transferidas para tubos Falcon[®] 5029 separados contendo 2 ml de meio LB Broth e ampicilina (50 µg/ml), a cada remoção da placa a alça de platina foi levada ao rubro em fogo. Os tubos entreabertos ficaram sob vigorosa agitação (250rpm) durante 8 horas a 37°C. Dos meios que se turvavam, uma alíquota para extração de DNA foi separada e feita a confirmação da presença do inserto por PCR utilizando-se iniciadores específicos para os genes, sob as mesmas condições de ciclagem do PCR, mas utilizando 5µl de DNA e diminuindo o volume de água para completar 25µl.

A amostra retirada de cada tubo Falcon consistiu de 50 µl que foram adicionados a um tubo Eppendorf de 1,5 ml contendo 50 µl de água estéril, a mistura foi aquecida a 95° C durante 15 minutos, submetida a centrifugação a 10.000 x g

durante 10 minutos. Foi então retirado 1µl do sobrenadante presente no tubo para amplificação por PCR com os mesmos iniciadores utilizados no item anterior.

Ao tubo contendo as bactérias com o vetor e inserto seqüenciado foi adicionado 3 ml de meio LB Broth e ampicilina (75 µg/ml), ficando este então sob vigorosa agitação (250rpm) durante 8 horas a 37°C. Após esse período foram adicionados 500 ml do mesmo meio, contendo ampicilina e novamente incubado nas mesmas condições durante toda a noite.

No dia seguinte, uma aliquota da suspensão bacteriana foi retirada, misturada com glicerol na concentração de 6:1 e congelada a -80°C. O restante foi transferido para frascos de 250 ml e centrifugado a 4500 rpm durante 15 minutos. O corpo de fundo resultante submetido à extração de DNA através do sistema Wizard[®] (Promega[®]). Brevemente, o corpo de fundo foi dissolvido com a solução de suspensão celular (Tris-HCl 50mM, pH 7.5; EDTA 10mM; RNase A 100µg/ml) e a este volume adicionado solução de lise (NaOH 0.2M; SDS 1%). Quando a solução se tornou clara e viscosa foi acrescido, ao volume, solução neutralizadora fornecida pelo “Kit” e o total centrifugado à 4500rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi então coletado e a ele adicionado isopropanol na concentração de 1:2. Novamente a mistura foi centrifugada a 4.500 rpm durante 15 minutos sob TA. O corpo de fundo obtido foi dissolvido com 2 ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.5; EDTA 1mM) e então acrescido de resina, também fornecida pelo “kit” pré-aquecida até sua homogeneização e resfriada à 30°C. A mistura DNA-resina foi então transferida para colunas, acondicionadas a um aparato de vácuo e submetidas a seguinte solução: NaCl 85mM; Tris-HCl pH 7.5, 8.5mM e EDTA 2mM. As colunas foram lavadas com álcool 80% e secadas sob vácuo. O DNA foi eluído da coluna com tampão TE pré-aquecido e estocado a 4°C. A concentração final do

DNA, assim como sua pureza, foram obtidas por densidade óptica em espectrofotômetro após 24 a 48 horas, afim de aguardar a precipitação do DNA.

4.9 Preparo das Sondas

Os plasmídeos foram então digeridos à 37°C durante aproximadamente 4 horas, em presença da enzima de restrição (na concentração de 15%), de acordo com o mapa do vetor fornecido pelo fabricante, do tampão indicado (na concentração de 10%) e de água, 25% do total. Esse procedimento foi realizado, para cada gene, com duas enzimas distintas para que obtenha, de acordo com a localização dos pontos de transcrição, uma sonda senso e um anti-senso (Quadro 4.4) e sua eficiência observada em gel de agarose 1% sob luz ultravioleta (Figura 4.2).

Sondas	Endonuclease de restrição
Senso β -actina	EcoRv
Anti-senso β -actina	BamHI
Senso WNT5A	PSTI
Anti-senso WNT5A	Not I
Senso HOXB5	BamHI
Anti-senso HOXB5	EcoRV

Quadro 4.4 - Lista de enzimas e tampões utilizados na linearização do DNA plasmideal

Legenda: C = DNA linearizado; NC = DNA não cortado; 1, 2, 3 = genes β -actina, WNT5A e HOXB5, respectivamente.

Figura 4.2 - Gel de linearização de DNA plasmideal

A síntese de RNA foi efetuada num tubo de 1,5ml contendo 1% de DNA linearizado, 40% de água, 1% de tampão de transcrição (10X), 1% de DTT (“Dithiothreitol”), 1% de oligonucleotídeos marcados com digoxigenina, 0,5% de inibidor de RNase e 0,5% de RNA polimerase, durante 2 horas a 37°C. A Tabela 6 resume as enzimas utilizadas para cada fita e cada gene.

A inspeção das sondas de RNA foi efetuada por meio de um gel de 1% de agarose em TAE contendo Brometo de Etídio na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. O resultado foi observado numa câmara de transluminescência e documentado em filme Polaróide⁷ (Figura 4.3). Após a inspeção do gel, ao RNA foi adicionado água, cloreto de lítio, DNase e etanol e armazenado a -20° C.

Sondas	Enzima restrição	Tampão	RNA polimerase
Senso β -actina	ECORV	B	Sp6
Anti-senso β -actina	BAMHI	BAMHI	T7
Senso WNT5A	PST1	B	T7
Anti-senso WNT5A	NOT1	A	T3
Senso HOXB5	ECORV	B	Sp6
Anti-senso HOXB5	BAMHI	BAMHI	T7

Quadro 4.5 - lista de enzimas e tampões utilizados na transcrição das sondas de RNA

Legenda: A – E = gene WNT5A (A e B), gene HOXB5 (C e D) e gene β -actina (E) ; 1 = DNA residual e 2 = produtos de transcrição dos genes estudados

Figura 4.3 - Gel de transcrição antes da digestão com DNase

4.10 Hibridização *In Situ*

O método utilizado foi o descrito previamente por Wu e Oh (1996) e a otimização foi feita para que ambos genes fossem realizados simultaneamente. As lâminas silanizadas em condições livres de RNase contendo cortes dos tecidos, previamente cortados em criostato com espessura de 10µm, foram descongeladas e deixadas para secar antes de serem submetidas à solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0.2% em PBS durante 10 minutos à TA. Após três lavagens com solução de PBT (100 ml de PBS, 10 ml Tween 20 a 10% e água estéril miliQ completando para 1000ml). As lâminas já transferidas para recipientes (TissueTek[®], VWR) e ficavam imersas na solução de PBT com a seqüência de 6% H₂O₂, proteinase K 7 µg/ml (Boehringer Mannheim[®], Indianapolis, IN), glicina 2 mg/ml. Novamente, as lâminas eram pós fixadas em paraformaldeído 4% com glutaraldeído 2% por 20 minutos. Cada incubação foi alternada com lavagens em PBT.

As lâminas assim processadas foram pré - hibridizadas em grupo de 4 em saco plástico desenvolvido por uma equipe de pesquisadores da Escola Politécnica da USP selado pelo calor, e imersas na solução de hibridização onde ficavam durante 1 hora a 45°C no forno de hibridização. A solução de hibridização consistia em formamida 50%, 5X SSC (pH 4.5), heparina 50 µg/ml, RNA de levedura 50 µg/ml, 1% SDS e água para completar 50 ml, pré aquecida a 45° C.

Antes de ser adicionada à solução de hibridização, a sonda de RNA foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, lavada com etanol 70% e centrifugada nas mesmas condições novamente. O precipitado foi dissolvido com 40 µl de água de onde foram retirados de 5µl para adição em cada saco plástico

contendo as lâminas em solução de hibridização. As lâminas ficavam incubadas nessa solução durante toda a noite, no forno de hibridização a 45°C.

No dia seguinte, as lâminas eram removidas dos sacos plásticos, recolocadas em recipientes e lavadas numa solução estrigente a 45°C, com 3 trocas de 15 minutos, num banho-maria sob agitação. Essa solução consistiu de formamida a 50%, 20X SSC (pH 4.5) a 30%, 10X SDS a 10% e 10% de água, pré aquecida a 45°C. O mesmo procedimento foi repetido para uma solução de formamida a 50%, 20X SSC (pH 4.5) a 12%, e 38% de água, à mesma temperatura, por três vezes.

As lâminas, então foram lavadas com uma solução contendo 10% de TBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, 25% de 1M Tris pH 7.5 e 75% de água), 0,1% de Tween 20, 0,04% de levamisole e 80% de água (TBST). Em seguida foram bloqueadas com soro fetal bovino à 10% nessa mesma solução durante 1 hora à TA.

Após o bloqueio, as lâminas eram novamente colocadas em grupo de 4 num saco plástico selado pelo calor, e imersas numa solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina onde ficaram durante 18 horas a 4°C sob agitação. Essa solução continha soro fetal bovino a 1:300 e anticorpo anti-digoxigenina a 1:2.000.

Terminada a incubação com o anticorpo, as lâminas eram lavadas extensivamente com TBST e então incubadas em NTMT (NaCl 5M à 2%, 2M Tris-HCl pH 9.5, MgCl₂ 2M à 2.5%, Tween 20 à 1% e levamisole à 0.048% em água). A detecção da reação deu-se no escuro, com NBT (75 mg/ml em dimetilformamida 30%) e BCIP (50 mg/ml em água) misturados com NTMT na concentração de 1:300 e 1:380 respectivamente, durante o tempo necessário para visualização do sinal. A reação de revelação foi bloqueada com PBT e EDTA (0.5M) na proporção de 1:500. O resultado da reação foi analisado e documentado fotograficamente em um microscópio Zeiss, Jenapol⁷.

4.11 Descrição do sinal observado para cada gene

A interpretação da técnica de hibridização ‘in situ’, basicamente baseia-se no contraste do fundo azul com a marcação, propriamente dita, mais intensa e específica. Trata-se de método qualitativo e exige certa experiência por parte dos avaliadores, que nesta dissertação foram três: a mestranda Fernanda Campos Sousa de Almeida, a doutoranda, cirurgiã – dentista e mestre em diagnóstico bucal , Cláudia Cazal Lira e o orientador desta dissertação Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes. Outra limitação do método diz respeito ao grande número de banhos aos quais o tecido congelado é submetido, vale lembrar que o tecido congelado, naturalmente menos resistente que espécimes embebidas em parafina, passa em média quatro dias, podendo chegar até 6 dias nesse estudo, sofrendo banhos em diferentes temperaturas, muitos deles sob agitação, outro tratamento fundamental é a exposição do tecido à proteinase K. Tantos passos levam o tecido a sofrer a perda de parte da sua integridade. Ainda assim, a técnica de ISH é considerada a melhor metodologia para localização de transcritos associada a morfologia. à despeito disso, a literatura consagrou o método de hibridização ‘in situ’, cabendo aos pesquisadores adaptarem-se à análise das lâminas.

Outro padrão, este estabelecido pelos pesquisadores, e que irá nortear a análise e discussão dos resultados, é de que os componentes epiteliais do tecido não neoplásico e tumoral merecerão especial atenção e serão foco de nossa análise.

Por tratar-se de método qualitativo, as afirmações de intensidade de marcação são baseadas nos sinais encontrados nos tecidos adjacentes tais como estoma, tecido glandular, dentre outros.

A exemplo do que foi feito nas reações de PCR, todos os cortes de tecido fresco foram submetidos à reação de hibridização “in situ” com sonda de RNA do gene constitutivo β -actina.

Diferentemente do WNT5A, o HOXB5 não possui literatura que colabore na interpretação dos achados por hibridização “in situ”. Para facilitar a análise, enriquecer a discussão, utilizamos metodologia já disponível no laboratório e iniciamos os estudos pela marcação do gene HOXB5 em embriões de camundongos, a fim de estabelecer a marcação do gene durante a embriogênese e posteriormente nos tecidos humanos.

5 RESULTADO

5.1 Características demográficas da amostra

A amostra estudada consistiu de 29 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca, e estava composta predominantemente de homens (63,3%; n = 18), de etnia branca (80%; n = 24) apresentando uma média de idade de 56,1 anos e estando a maioria na sexta década de vida (30%, n = 9). A maioria dos tumores estava localizada na língua (80%, n = 24), seguida dos lábios e soalho bucal. Espessura tumoral maior que um centímetro foi verificada em 58,3% (n = 14) dos casos. O tamanho dos tumores variou de 0,9 a 9 cm, tendo 3,27 cm em média.

Para os pacientes com dados informados na tabela 5.1 foi observado que o estadiamento pós-operatório TNM foi como se segue: 4 pacientes pT1(2 pacientes N0, 1N1, 1N2a)M0, 9 pacientes pT2(6 pacientes N0, 2N1, 1N2a)M0, 1 paciente T3(N2)M0 e 13 pacientes pT4(2NX, 6N0, 1N1, 2N2, 2N3)M0. Quanto à classificação UICC, 33,3% (n = 9) eram casos iniciais ou precoces e 66,7% (n = 18) casos avançados. A avaliação do estudo histopatológico para diferenciação celular mostrou que 56,6% (n = 13) dos tumores eram moderadamente diferenciados, 34,7 % (n = 8) bem diferenciados e 8,7% (n = 2) pouco diferenciados. Vale ressaltar que foi perdido o seguimento de seis doentes. Dezesete doentes permanecem livre de doença, cinco morreram pelo câncer e um morreu por outra causa.

5.2 β -actina

A sonda da β -actina foi positiva em todos os casos analisados confirmando a reatividade do tecido. A marcação obtida, já vem sido descrita na literatura e tratou-se de um sinal esparso e de diferentes intensidades em todos os tecidos que compunham o quadro histológico (dados não mostrados).

5.3 WNT5A

A análise das lâminas confirmou a presença do transcrito tanto no epitélio normal, quanto no neoplásico.

Na análise dos fragmentos de tecido epitelial adjacentes à neoplasia e morfologicamente sem alterações neoplásicas observou-se um padrão de marcação consistente, que se repetiu em diferentes áreas do epitélio no mesmo quadro histológico. Dois padrões foram observados na marcação epitelial, o primeiro revelou concentração dos transcritos do gene WNT5A nas camadas superficiais do epitélio (Figura 5.2.A) e, no segundo, apenas áreas ocasionais apresentavam sinal (Figura 5.2.B).

Em epitélios que apresentavam graus de atipia variáveis, era clara a inversão de relação da localização dos transcritos, ou seja, a marcação dava-se nas camadas mais profundas do epitélio, na interface com o tecido conjuntivo (Figura 5.2.C).

No componente epitelial neoplásico observou-se diferentes intensidades de sinais, na dependência da diferenciação histológica. Células organizadas em ilhotas epiteliais neoplásicas e, mais diferenciadas, apresentavam marcação mais homogênea e, mais intensa quando comparada com o estroma (Figuras 5.2.D). O mesmo ocorre com as ilhotas epiteliais formando pérolas córneas (Figura 5.2.E). Tumores menos diferenciados como o da Figura 5.2.F, apresentaram marcação mais tênue, sem grande contraste com o estroma.

Como achados adicionais, pode-se citar que na lâmina própria, além da marcação do mesênquima do tumor e do tecido normal (Figuras 5.2.A e 5.2.B) , a grande maioria dos vasos apresentavam marcação (Figura 5.1.A) e quando analisados os componentes da submucosa, as glândulas salivares menores apresentam sinal nas unidades acinares, independente de serem serosas (Figura 5.1.B) ou mucosas (Figura 5.1.C). O tecido muscular apresentou-se negativos (Figura 5.1. D) e a Figura 5.1E. exemplifica a ausência de sinal da sonda “sense” para o gene WNT5A.

Legenda - VS – vaso; GSS – glândula salivar serosa; DEG – ducto excretor de glândula; GSM – glândula salivar mucosa; MM – músculo; PP – processo palatino; CM – cartilagem de Merkel; L – língua; ML – músculo liso; END – células endoteliais; ES – estroma.

Figura 5.1 - (A) - marcação em parede de vaso; (B) – marcação em glândula salivar serosa e em ducto excretor; (C) - marcação em componente acinar de glândula salivar mucosa; (D) – tecido muscular negativo para o gene WNT5A; (E) - sonda sense; (F) - marcação difusa em cabeça de camundongo em desenvolvimento, observar a marcação específica, porém discreta, em tecidos de diferentes origens (cartilagem, epitélio e mesênquima); (G) - marcação exclusiva em células endoteliais e ausência de marcação em musculatura lisa; (H) - marcação em glândula salivar serosa, em seus componentes acinares, com concentração em regiões específicas do corte histológico, observação marcação em ducto excretor; (I) – marcação em musculatura estriada esquelética; (J) – padrão em glândula salivar mucosa, com marcação apenas no estroma da glândula; (L) – marcação em infiltrado inflamatório mononuclear; (M) – sonda “sense”.

WNT5A

HOXB5

FIGURA 5.1

Legenda – LP – lâmina própria; EP – epitélio; CA – componente neoplásico do carcinoma; ES – estroma; PC – pérola córnea.

Figura 5.2 – (A) – tecido normal com concentração do sinal nas camadas superficiais do epitélio, observar marcação intensa na lâmina própria; (B) – segundo padrão de marcação do epitélio, quando este apresentava projeções para lâmina própria, a lâmina própria mantém marcação; (C) – marcação nas camadas basal e supra – basal do epitélio apresentando atipia; (D) – marcação em células neoplásicas organizadas em ninhos no estroma tumoral; (E) – marcação intensa nas células tumorais que secretam queratina; (F) – marcação tênue em regiões neoplásicas menos diferenciadas.

Figura 5.2

5.3 HOXB5

A expressão do Hoxb5 em cabeça de camundongos em desenvolvimento, à despeito de não ser objetivo dessa dissertação, colaborou muito para direcionar a análise dos dados encontrados. O Hoxb5 revelou-se um gene com expressão difusa; todos os tecidos foram positivos, com pequenas diferenças quanto à intensidade de marcação. Portanto o gene mostrou-se com expressão difusa e basal nos cortes de camundongos (Figura 5.1. F).

Nos tecidos obtidos à margem da neoplasia, o epitélio não tumoral mostrou-se com dois padrões de marcação: em epitélios mais planos, as células do epitélio não se mostraram marcadas (Figura 5.3. A) ou, em outras áreas, com projeções em direção à lâmina própria, observava-se marcação em todas as camadas do epitélio, de forma dispersa (Figura 5.3. B).

No epitélio neoplásico, a marcação foi observada em células mais diferenciadas formando ilhotas, mas com pleomorfismo celular (Figura 5.3. C e D).

Como achados adicionais, na lâmina própria os vasos foram positivos apenas as células endoteliais, mantendo negativa a musculatura lisa (Figura 5.1. G). As glândulas serosas (Figura 5.1. H) tecidos musculares esquelético (Figura 5.1.I) e ainda, ductos excretores (Figura 5.1.H) e estroma de glândulas salivares menores (Figura 5.1.J) também foram positivos para os transcritos do HOXB5, assim como as células inflamatórias mononucleares se (Figura 5.1. L). A figura 5.3. M exemplifica a ausência de marcação da sonda “sense”.

Legenda – EP – epitélio; LP – lâmina própria; ES – estroma; CA – célula neoplásico.

Figura 5.3 – (A) – epitélio normal com apresentação mais plana, sem sinal para o gene HOXB5; (B) – epitélio com projeções para o tecido conjuntivo, apresentando marcação dispersa pelas camadas epiteliais, observar marcação do mesênquima; (C) – marcação em células neoplásicas organizadas em ninhos, observar concentração em sinal alguns grupo celulares; (D)- região de ilhota neoplásica com acentuado sinal, observar o pleomorfismo celular.

Figura 5.3

6 DISCUSSÃO

A busca por marcadores prognósticos que traçassem o perfil de uma dada neoplasia maligna e tornassem uniformes as terapêuticas oncológicas foram, progressivamente, sendo substituída pelo conceito de que a doença, na verdade, deve ser abordada com suas particularidades. Portanto, atualmente a busca por marcadores que individualizem a abordagem terapêutica do câncer tem sido muito estudada. Endossando este fato, inúmeros trabalhos revelam que grande parte dos tumores de mesma localização e tipo histológico responde de forma similar à terapêutica. Enquanto, há uma parcela significativa que foge do padrão, respondendo muito mal ou muito bem à terapêutica estabelecida (RHEE et al., 2002; URAGUCHI et al., 2004).

Rhee et al. (2002) observaram a expressão de genes da família WNT e seus receptores em dez espécimes de tecidos normais da cavidade bucal e dez carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Nenhum dos tecidos normais expressaram quaisquer WNTs. Entretanto nos tumores a expressão variou de 4 a 10 genes por tumor, dependendo do gene em questão. Em nosso laboratório, trabalhos prévios a esta dissertação revelaram que a amplificação por RT-PCR de transcritos do gene WNT5A dos tumores de boca variou na dependência de parâmetros clínicos e histopatológicos que serão melhor explorados no decorrer deste capítulo de discussão (ALMEIDA et al., 2004). Trabalhos utilizando a tecnologia de micro arranjo afirmam categoricamente que seus resultados apontam para o caráter individual do

câncer e do hospedeiro. Al Moustafa et al. (2002) identificaram em mais de 12.000 genes analisados, cerca de 200 que apresentaram variação entre tecido normal e carcinoma epidermóide de boca do mesmo paciente. Dentre eles, o gene WNT5A mostrou-se menos expresso nos tumores em relação a tecidos normais do mesmo paciente e os autores afirmam que as metodologias moleculares, futuramente, traçarão o perfil individual da neoplasia e seu hospedeiro e nortearão os atos médicos. Em estudos com culturas de células imortalizadas o padrão parece respeitar o que se observa com tecidos frescos. Um estudo japonês revelou que em 14 culturas de carcinoma epidermóide de boca estudadas para 11 genes da família WNT, nenhum dos transcritos apresentou algum padrão de expressão identificável para todos os casos (URAGUCHI et al., 2004).

No que diz respeito às características clínicas dos doentes, amostra estudada, de 29 pacientes colhida aleatoriamente, respeitou a média do perfil de pacientes atendidos na Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP (DURAZZO et al., 2001).

A aplicação de técnicas para estudo de RNA mensageiro, tais como, RT-PCR, “Northen Blotting”, micro arranjo, dentre outras, em um macerado de tecido contendo diversos tipos celulares, pode trazer resultados não conclusivos, à medida que não se pode afirmar qual a célula está expressando um dado gene. Em culturas de células, que sabidamente adquirem alteração fenotípica e genotípica, há uma limitação própria do método quanto à transposição dos resultados “in vitro” para a prática clínica (HAWKSWORTH, 1994; PARCHMENT; NATARAJAN, 1992). As micro disseções manual ou à laser, por sua vez, sempre trazem consigo a captura de estroma e células não neoplásicas (FULLER et al., 2003) e, portanto, apesar de mais específica que os macerados de tecido, sempre devem gerar no

pesquisador ressalvas com relação às afirmativas categóricas. Todas essas técnicas são importantes instrumentos para estudos de transcritos, mas nenhuma delas localiza o RNA mensageiro e permite afirmativas sobre a relação direta da expressão de um gene com o processo neoplásico em si e seus arranjos teciduais e celulares.

Em absoluta oposição, a hibridização “in situ” permite localizar transcritos e foi a técnica de eleição deste estudo. Nossos achados nos permitiram inferir alguns dos processos pelos quais os genes passam durante a transformação maligna, sua relação com tecidos adjacentes e com características clínicas e histológicas de cada espécime, no que tange ao carcinoma epidermóide de boca.

Aparentemente as populações celulares que apresentaram transcritos dos dois genes são diferentes e não se pôde, com a metodologia empregada, estabelecer relação entre os genes estudados. Sendo assim, as discussões serão feitas em separado para os genes WNT5A e HOXB5.

6.1 WNT5A

O gene WNT5A está presente fundamentalmente, durante a embriogênese, nos componentes mesenquimais, tal como descrito na morfogênese da papila dental (NUNES, 2002) no mesmo trabalho o autor afirma não ter identificado sinal do gene em epitélio da face ou da boca. Por outro lado, em outros tecidos, o WNT5A foi observado em componentes epiteliais como, por exemplo, no epitélio especializado dos pulmões (LI et al., 2002). Nossos achados revelam dois padrões de marcação e,

portanto, pode ou não apresentar sinal do WNT5A no epitélio adjacente à neoplasia. Não podemos afirmar que o tecido não tumoral não apresenta nenhum tipo de alteração molecular, mesmo sem atipias celulares aparentes, à medida que mais de 50% dos nossos pacientes eram tabagistas e, portanto, sujeitos a fatores de risco, como sugere a teoria da cancerização de campo (BRAAKHUIS et al., 2002 ; THOMSON et al., 2002).

O fato é que nesses tecidos sem alterações histopatológicas, a marcação foi basicamente concentrada nas camadas superficiais do epitélio ou quase inexistente, em poucas células sem um estrato celular preferencial ao contrário do que ocorreu em tecidos com algum grau de atipia; nestes casos a marcação foi concentrada nas camadas basal e supra-basal do epitélio. Alterações do comportamento do WNT5A nas camadas do epitélio em situações diferentes de agressão foram descritas por Mysorekar et al. (2002) que estudando o comportamento desse gene no epitélio urinário submetido a infecção por *Escherichia coli* observaram a presença do transcrito do Wnt5a em todas as camadas epiteliais não infectadas, e que após 6 horas de exposição bacteriana, os níveis de RNAm foram diminuindo nas células do estrato intermediário, levando os autores a imaginarem que o gene desempenharia algum papel na transição de células basais para células da camada espinhosa. Os autores acrescentaram que a presença ou não do WNT5A em todas as camadas do epitélio poderiam ajudar a verificar o potencial cancerizável do epitélio. Por outro lado, Uraguchi et al. (2004) afirmaram ter identificado, pela primeira vez na literatura, a expressão da proteína wnt3 nas camadas suprabasais dos epitélios normais de cavidade bucal estudadas. Nossos achados não permitem transpor os resultados para lesões cancerizáveis de boca, dada a pequena amostra de casos e áreas de atipia celular. De maneira similar a Uraguchi et al. (2004) é possível que a presença

do transcrito do WNT5A possa direcionar a implementação de terapêuticas adjuvantes no tratamento do câncer de boca no futuro.

O papel da camada basal na carcinogênese oral é muito bem estabelecido, (KOTELNIKOV et al., 1996) por ser a camada responsável por proliferar e iniciar o processo de diferenciação. A presença do transcrito do gene WNT5A nessa camada, nos casos de atipia, deve ser mais explorada, pois não podemos ignorar a hipótese de que esse gene pode estar relacionado com a gênese do câncer de boca e é candidato à marcador prognóstico na progressão de lesões cancerizáveis, assim como na prevenção de recidivas locais e surgimento de segundos tumores primários já mencionados no parágrafo acima.

Ao contrário do que ocorre no epitélio normal, no tumor a marcação é sempre evidenciada e o que vai variar é a intensidade, mensurada pelo contraste com o estroma tumoral, e a localização desse sinal. Em tumores bem diferenciados, apresentando pérolas córneas, o que se observa é uma intensa marcação nas células que secretam queratina e, em células organizadas em ninhos epiteliais. Em oposição, as células menos diferenciadas, mais fusiformes e dispersas pelo estroma são menos marcadas. Mais uma vez, esses achados nos levam a crer que o gene em estudo pode desempenhar papel na diferenciação ou na sua perda durante a carcinogênese e progressão do câncer. Nenhum artigo constante na literatura científica faz distinção entre as classificações histológicas dos carcinomas, e a localização do WNT5A em tumores de boca, mas a embriogênese nos mostra que esse gene está presente em processos importantes de diferenciação celular, como no epitélio pulmonar especializado (LI et al., 2002) e em pele, o WNT5A é fundamental para diferenciação do folículo piloso (REDDY et al., 2001). Em contraste aos nossos resultados, em tumor colorretal, há relato de expressão apenas

nas células epiteliais mais fusiformes e menos diferenciadas, assim como em células epiteliais próximas a áreas de úlceras e frentes de invasão. Os autores ainda relatam que há expressão intensa no estroma tumoral em todos os casos analisados (SMITH et al., 1999).

Comparando nossos achados de hibridização 'in situ' com os resultados prévios de PCR (ALMEIDA et al., 2004) parecem coerentes os achados de que em tumores mais espessos e maiores, sabidamente mais agressivos e com curso clínico conhecido, tenha-se menos marcação do transcrito na ISH, assim como, de fato, ocorreu nas reações de PCR. A relação inversa entre tamanho e espessura e amplificação do gene, foi testada com $p=0,00009$. A hibridização "in situ" nos mostra que apesar de menor e mais tênue, a localização dos transcritos é concentrada em células tumorais e é tão mais freqüente quanto maior for o grau de diferenciação celular.

A literatura nos mostra, a cada dia, que estudar carcinoma é, inseparavelmente, estudar a relação das células tumorais com o mesênquima e nossos achados nos remetem a refletir um pouco sobre esta relação. Shimada et al. (2000) afirmam que o aumento da expressão de membros da família WNT (via canônica) em células de carcinoma epidermóide de boca, assim como em metástases regionais, levam a um aumento de MMPs (metaloproteinases) e, conseqüentemente, sugerem que isso aumentaria o poder de invasão desses tumores. Corroborando com a hipótese de que vias canônica e não canônica desempenhariam papéis antagônicos, células normais mamárias foram submetidas à metodologia de "antisense" para o WNT5A. Nesses casos observou-se uma diminuição de cerca de 50% na produção de colágeno tipo I e aumento da motilidade celular em matrigel®. Em outro estudo, com células de carcinoma

epidermóide humano, incluindo de boca, os autores reafirmam a oposição das vias, mas, ao contrário de nossos achados e de Shimada, eles concluíram que a diminuição da expressão de WNT4 (via canônica) e a super- expressão do WNT5A seriam marcadores de mau prognóstico e aumento da capacidade de invasão dos tumores (TAKI et al., 2004). Esses artigos, mais uma vez, nos levam a pensar nas limitações dos estudos em células imortalizadas, à medida que foram inseridas variáveis em células que para sobreviverem adquirirem mutações importantes, como as do estudo de Taki que exibem mutação no gene da E-cadherina, gene este relacionado com a via da β -catenina e, portanto, do WNT (via canônica).

Os achados em outros tecidos que compunham o quadro histológico revelam que o WNT5A pode ser alvo de estudo em processos patológicos de glândulas salivares menores ou de musculatura estriada esquelética. Outro processo que poderia ser abordado é a neoangiogênese presente em processos tumorais, já que as células endoteliais apresentaram marcação em quase todos os vasos que se observava. Mas definitivamente, esta é uma outra e profunda discussão, que não alvo desta dissertação.

Esta dissertação, mais do que respostas, gera perguntas e abre outras possibilidades de estudos. O gene WNT5A localizado nestes experimentos estaria ligado ou não ao seu receptor? Qual dos fatores da matriz extra celular sofreriam a interferência da variação de expressão do WNT5A? Há relação entre as vias canônicas e não canônicas, no que tange o sinal de transcritos? Se há relação, ela seria antagônica? Como podemos observar, há muito a ser perguntado e mais ainda a ser respondido e a nós nos cabe continuar pesquisando, perguntando e respondendo.

6.2 HOXB5

A expressão do Hoxb5 em cabeça de camundongos em desenvolvimento revelou um gene com expressão difusa, na qual todos os tecidos eram positivos, com pequenas diferenças quanto à intensidade de marcação. Portanto, o gene mostrou-se com expressão discreta e basal nos cortes de camundongos, dado já referido, para trato digestivo, por Sakiyama, Yokouchi e Kuroiwa (2001) e inédito no que tange o desenvolvimento facial.

Em 1987, foi publicada a primeira pesquisa caracterizando a expressão do Hoxb5 na embriogênese. Os autores afirmavam naquela ocasião que o gene Hoxb5, denominado até então de HOX 2.1, poderia ser encontrado em tecidos em desenvolvimento e em adultos (KRUMLAUF et al., 1987). O mesmo grupo definiu que a expressão do Hoxb5 respeitava uma relação ântero-posterior e que havia uma concentração de RNAm no mesencéfalo, pulmão e em componentes mesodérmicos de arcos branquiais.

Até hoje, apenas 46 artigos foram publicados sobre o Hoxb5 e a grande maioria deles está relacionada com embriogênese, especialmente do sistema nervoso central. Com base na literatura, nossa primeira hipótese foi de que a metodologia empregada pelo projeto genoma para caracterizar genes envolvidos em tumores de cabeça e pescoço poderia ter incluído tumores de natureza no sistema nervoso central, pois há relatos de alterações do gene hoxb5 em tumores tais como: glioblastoma e ependimomas (KORSHUNOV et al., 2003). Esta hipótese não pode ser descartada, mas o fato é que pudemos observar claramente a expressão do

gene no componente tumoral do carcinoma epidermóide de boca e, em Tucci (2003), já se havia relatado um aumento da expressão do gene de CEB.

Apesar de encontrarmos sinal do gene em diversos tecidos, não há textos na literatura que endosse nossos achados. Tucci (2003), já havia definido um aumento da amplificação do gene HOXB5 em carcinoma epidermóide boca em relação ao tecido normal adjacente, mas no mesmo trabalho ela questionava se seria mesmo o componente epitelial da neoplasia que geraria este aumento da expressão. Aparentemente o aumento observado por Tucci é mesmo às custas da presença do transcrito na célula tumoral. Ao contrário do que observamos nos tecidos normais, incluindo o epitélio, a marcação no tumor é intensa e específica e é possível definir com precisão o citoplasma da célula tumoral e afirmar, mesmo que de forma qualitativa, que há um expressivo aumento do transcrito nas células tumorais. Parece-nos que o gene perde aquela característica descrita em 2001, de expressão discreta e passa a expressar intensamente o gene HOXB5. Em 1992, há um único relato da relação do gene HOXB5 com carcinoma, mas esses achados diferem dos nossos à medida que os autores não encontraram o transcrito do gene em tumores de rim e sim no tecido normal (CILLO et al., 1992).

A exemplo do que a literatura relata, o sinal do HOXB5 apresentou sinal, no tecido normal, preferencialmente no mesênquima, mas nossas observações adicionam uma informação inédita, a de que há uma forte marcação na transição epitélio– mesênquima. A metodologia empregada não permite afirmar se o sinal encontra-se na camada basal do epitélio ou na lâmina basal. Krumlauf et al. (1987) a exemplo do que ocorreu conosco, observaram concentração do sinal do gene *hoxb5* em células mesodérmicas que circundavam a camada epitelial de arcos branquiais, e eles acreditam ser marcação mesenquimal. Nossos achados abrem frente para

estudos sobre a importância ou relação que esse gene desempenharia na sinalização epitélio-mesênquima. Quanto à coloração no tecido conjuntivo, para esclarecermos se o sinal observado é marcação ou não, futuramente pode-se usar dupla marcação com anticorpos sabidamente positivos para fibroblasto.

Outros achados que não eram objetivos dessa dissertação, mas que reafirmam dados da literatura, dizem respeito à marcação em inúmeros vasos sanguíneos (BERGWERFF et al., 1999 a ; BERGWERFF et al., 1999 b). Não foram avaliados se há alteração no padrão de marcação de vasos neoformados ou com embolizados por neoplasia, mas essa pode ser uma linha promissora no estudo do HOXB5. A marcação em glândulas serosas, em estroma de qualquer tipo de glandular e de tecidos musculares estriados esqueléticos podem relacionar o gene HOXB5 e suas alterações e mutações com processos de saúde e doença desses tecidos.

Os achados do HOXB5 revelam um gene que apresenta marcação em diversos tecidos, além dos epitélios normais e neoplásico, e, apesar de não possuir estudos em carcinogênese, pode ser investigado em tumores de origens diversas, além dos carcinomas. Esses resultados ajudam a esclarecer perguntas elaboradas por Tucci (2003), já que, pode-se afirmar que há presença do transcrito do gene HOXB5 no componente neoplásico do carcinoma, mas ainda não é possível entender o processo pelo qual este mecanismo pode se dar, já que não se conhece quase nada sobre as vias de sinalização do HOXB5. Portanto, estudos em cultura de célula poderiam colaborar muito para esclarecer esta e outras perguntas.

Finalmente, a hibridização “in situ” cumpriu seu papel e localizou os transcritos nos tecidos estudados, esclarecendo dúvidas geradas por trabalhos prévios realizados no Laboratório de Patologia Molecular da FOU SP abre-se,

portanto, uma nova e promissora frente com auxílio da técnica de hibridização “in situ” aplicada a investigação na carcinogênese, já que este método já vem sendo aplicado pelo grupo, com sucesso, em desenvolvimento embrionário.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 Foi possível localizar o transcrito do gene WNT5A no epitélio não neoplásico, em células das camadas superficiais do epitélio ou, ainda, pontualmente dispersas pelo epitélio. Nas células neoplásicas do carcinoma epidermóide de boca sempre foi observado o transcrito.
- 7.2 Foi possível localizar o transcrito do gene HOXB5 de forma dispersa pelas camadas do epitélio não neoplásico quando esse apresentava projeções para o epitélio, assim como no carcinoma epidermóide de boca.
- 7.3 Houve relação entre os achados de hibridização “in situ” e características histopatológicas para o gene WNT5A, com diminuição do sinal em tumores menos diferenciados e concentração do transcrito em regiões bem diferenciadas.
- 7.4 Não foi possível relacionar o padrão de marcação do HOXB5 com características histopatológicas da neoplasia.

REFERÊNCIAS¹

Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, et al. The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res* 1989;17(24):10385-402.

Akam M. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 1989 5;57(3):347-9.

Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21(17):2634-40.

Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257(3):738-45.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

Almeida FCS, Cazal, C, Brandão TB, da Silva DP, Durazzo MD, Britto e Dias R, et al. Carcinoma epidermóide de boca: Aspectos clínicos e impacto prognóstico. *Rev Bras Odontop e Clin Integradas*. No Prelo/2004a.

Almeida, FCS, Silva-Valenzuela, MG, Cazal, C, Lorenzoni, S, Durazzo, MD, Tavares, et al. "WNT5A gene mRNA expression in oral squamous cell carcinoma with adjacent normal tissue", International Conference on Head and Neck Cancer, In: Abstracts of the 6th Annual Meeting. Washington: American Head and Neck Society; 2004.

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

Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000;29(7):291-8.

Bergwerff M, DeRuiter MC, Hall S, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Unique vascular morphology of the fourth aortic arches: possible implications for pathogenesis of type-B aortic arch interruption and anomalous right subclavian artery. *Cardiovasc Res* 1999;44(1):185-96.

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

Blatt C, Sachs L. Deletion of a homeobox gene in myeloid leukemias with a deletion in chromosome 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156(3):1265-70.

Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in breast carcinomas. *Anticancer Res* 2000;20(5A):3281-6.

Borges AM, Shrikhande SS, Ganesh B. Surgical pathology of squamous carcinoma of the oral cavity: its impact on management. *Semin Surg Oncol* 1989;5(5):310-7.

Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002;24(2):198-206.

Calvo R, West J, Franklin W, Erickson P, Bemis L, Li E, et al. Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(23):12776-81.

Canto MT, Horowitz AM, Child WL. Views of oral cancer prevention and early detection: Maryland physicians. *Oral Oncol* 2002;38(4):373-7.

Celetti A, Barba P, Cillo C, Rotoli B, Boncinelli E, Magli MC. Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia. *Int J Cancer* 1993;53(2):237-44.

Chariot A, Castronovo V. Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222(2):292-7.

Cianfriglia F, Di Gregorio DA, Manieri A. Multiple primary tumours in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35(2):157-63.

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

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

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

Clark RM, Rosen IB, Laperriere NJ. Malignant tumors of the head and neck in a young population. *Am J Surg* 1982;144(4):459-62.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia funcional e estrutural*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, et al. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 2001;20(50):7437-46.

Desplan C, Theis J, O'Farrell PH. The *Drosophila* developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* 1986;318(6047):630-5.

DiMilla PA, Barbee K, Lauffenburger DA. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J* 1991;60(1):15-37.

Durazzo MD, Silva Filho GB. Tratamento do câncer da cavidade oral. *Rev de Med* 1997;76(5):256-9.

Durazzo MD, Tavares Mr, Araújo CEN, Neto JSB, Matsunaga P, Potenza AS et al. Perfil dos portadores de câncer da cavidade oral operados de 1994 a 1998: predomínio de doença local avançada e aumento da incidência de mulheres. *Ver Bras Cir Cabeça e Pescoço*, 2001; 25(1-2): 7-10.

Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M. Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994;345(1313):269-75.

Fedele DJ, Jones JA, Niessen LC. Oral cancer screening in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1991;39(9):920-5.

Ford HL. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? *Cel Biol Int* 1997;22(6):397-400.

Fuller AP, Palmer-Toy D, Erlander MG, Sgroi DC. Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8(3):335-45.

Gaunt SJ, Miller JR, Powell DJ, Duboule D. Homeobox gene expression in mouse embryos varies with position by the primitive streak stage. *Nature* 1986;324(6098):662-4.

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

Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 1989;57(3):367-78.

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.

Hawthornth GM. Advantages and disadvantages of using human cells for pharmacological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol* 1994;13(8):568-73.

Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Sowers R, Mazza B, Yang R, et al. Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer* 2004;109(1):106-11.

Hoey T, Warrior R, Manak J, Levine M. DNA-binding activities of the *Drosophila melanogaster* even-skipped protein are mediated by its homeo domain and influenced by protein context. *Mol Cell Biol* 1988;8(11):4598-607.

Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway *J Cell Sci* 2002;115(Pt 21):3977-8.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil.

<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2003/estimativas.html>. 13/09/20034.

Iozzo RV, Eichstetter I, Danielson KG. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Cancer Res* 1995;55(16):3495-9.

Jackson IJ, Schofield P, Hogan B. A mouse homoeo box gene is expressed during embryogenesis and in adult kidney. *Nature* 1985;317(6039):745-8.

Jonsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 2002;62(2):409-16.

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

Kappen C. Hox genes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15(2):156-62.

Karakida K, Ota Y, Aoki T, Yamazaki H, Tsukinoki K. Examination of factors predicting occult metastasis of the cervical lymph nodes in T1 and T2 tongue carcinoma. *Exp Clin Med* 2002;27(3):65-71.

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

Kokemueller H, Brachvogel P, Eckardt A, Hausamen JE. Neck dissection in oral cancer--clinical review and analysis of prognostic factors. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31(6):608-14.

Korshunov A, Neben K, Wrobel G, Tews B, Benner A, Hahn M, et al. Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. *Am J Pathol* 2003;163(5):1721-7.

Kotelnikov VM, Coon JS, Taylor S, Hutchinson J, Panje W, Caldarell DD, et al. Proliferation of epithelia of noninvolved mucosa in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 1996;18(6):522-8.

Krumlauf R, Holland PW, McVey JH, Hogan BL. Developmental and spatial patterns of expression of the mouse homeobox gene, Hox 2.1. *Development* 1987;99(4):603-17.

Kuhl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech Dev* 2001;106(1-2):61-76.

Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, et al. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):266-71.

Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, Cherian T, Sugar AW, Scully C, et al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B(2):113-20.

Largey JS, Meltzer SJ, Sauk JJ, Hebert CA, Archibald DW. Loss of heterozygosity involving the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77(3):260-3.

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

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

Lejeune S, Huguet EL, Hamby A, Poulsom R, Harris AL. WNT5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 1995;1(2):215-22.

Leon X, Quer M, Orus C, del Prado Venegas M, Lopez M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck* 2000;22(7):680-6.

Li C, Xiao J, Hormi K, Borok Z, Minoo P. Wnt5a participates in distal lung morphogenesis. *Dev Biol* 2002;248(1):68-81

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37(5):401-18.

Louro ID. Proto-oncogenes e genes supressores de tumor. In: Louro ID, Herena Júnior, JC, Melo MSV, Ashton-Prolla, P, Conforti-Froes N. *Genética molecular do câncer*. São Paulo: MSG; 2002. Cap 6, pt2A, p. 66-79.

McGregor AD, Rennie JS. Intra-oral squamous cell carcinoma in patients under 40 years of age. A report of 13 cases and review of the literature. *Br J Plast Surg*. 1987;40(3):270-3.

McMahon AP, Moon RT. int-1--a proto-oncogene involved in cell signalling. *Development* 1989;107 Suppl:161-7.

Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O'Shea R, Brasure J, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B(1):9-15.

Mashberg A. Oral cavity cancer in non-users of tobacco. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(18):1525.

Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers [Review]. *CA Cancer J Clin* 1995;45(6):328-51.

Miguel MCC, Amorim RFB. Multifuncionalidade da beta-catenina e suas complicações na patologia. *Rev Bras Patol Oral* 2004;3(2):57-61.

Mishra RC, Parida G, Mishra TK, Mohanty S. Tumour thickness and relationship to locoregional failure in cancer of the buccal mucosa. *Eur J Surg Oncol* 1999;25(2):186-9.

Mohr C, Bohndorf W, Gremmel H, Harle F, Hausamen JE, Hirche H, et al. Preoperative radio-chemotherapy and radical surgery for advanced carcinomas of the oral cavity. 4-year results of a prospective therapy study with DOSAK. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1990;14(4):242-9.

Moon RT, Shah K. Developmental biology: signalling polarity. *Nature* 2002;417(6886):239-40.

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

Mysorekar IU, Mulvey MA, Hultgren SJ, Gordon JI. Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2002;277(9):7412-9.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303(5663):1483-7.

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

Nunes FD. Título Expressão de transcritos dos genes BMP4, WNT5A e SHH durante o desenvolvimento craniofacial de camundongos [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Nusse R. An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet* 2001;17(8):443.

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982;31(1):99-109.

Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992;69(7):1073-87.

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 1991;64(2):231.

O'Brien CJ, Lauer CS, Fredricks S, Clifford AR, McNeil EB, Bagia JS, et al. Tumor thickness influences prognosis of T1 and T2 oral cavity cancer--but what thickness? *Head Neck* 2003;25(11):937-45.

Olson DJ, Gibo, DM. Antisense Wnt5a mimics Wnt-1 mediated C57MG mammary epithelial cell transformation. *Exp Cell Res* 1998;241:134-41.

Olson DJ, Papkoff J. Regulated expression of Wnt family members during proliferation of C57MG mammary cells. *Cell Growth Differ* 1994;5:197-206.

Parchment RE, Natarajan K. A free-radical hypothesis for the instability and evolution of genotype and phenotype in vitro. *Cytotechnology* 1992;10(2):93-124.

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

Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus. *Science* 2000;287(5458):1606-9.

Perkins SL, Link DC, Kling S, Ley TJ, Teitelbaum SL. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces monocytic differentiation of the PLB-985 leukemic line and promotes c-fgr mRNA expression. *J Leukoc Biol* 1991;50(5):427-33.

Petruzzelli GJ, Knight FK, Vandevender D, Clark JI, Emami B. Posterior marginal mandibulectomy in the management of cancer of the oral cavity and oropharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(6):713-9

Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, Morrissey EE, et al. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev* 2001;107(1-2):69-82.

Reuter R, Panganiban GE, Hoffmann FM, Scott MP. Homeotic genes regulate the spatial expression of putative growth factors in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *Development* 1990;110(4):1031-40

Rhee CS, Sen M, Lu D, Wu C, Leoni L, Rubin J, et al. Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 2002;21(43):6598-605.

Rieger E, Bijl JJ, van Oostveen JW, Soyer HP, Oidejans CB, Jiwa NM, et al. Expression of the homeobox gene HOXC4 in keratinocytes of normal skin and

epithelial skin tumors is correlated with differentiation. *J Invest Dermatol* 1994;103(3):341-6.

Sabbaga J. Oncogenes e antioncogenes. In: Parise. O câncer de boca: aspectos clínicos e terapêuticos. São Paulo: Elsevier; 2000. cap. 4, p. 23-8.

Saitoh A, Hansen LA, Vogel JC, Udey MC. Characterization of Wnt gene expression in murine skin: possible involvement of epidermis-derived Wnt-4 in cutaneous epithelial-mesenchymal interactions. *Exp Cell Res* 1998;243(1):150-60.

Sakiyama J, Yokouchi Y, Kuroiwa A. HoxA and HoxB cluster genes subdivide the digestive tract into morphological domains during chick development. *Mech Dev* 2001;101(1-2):233-6.

Schumacher R, Mai A, Gutjahr P. Association of rib anomalies and malignancy in childhood. *Eur J Pediatr* 1992;151(6):432-4.

Schwartz JL. Biomarkers and molecular epidemiology and chemoprevention of oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(1):92-122.

Scott GA, Goldsmith LA. Homeobox genes and skin development: a review. *J Invest Dermatol* 1993;101(1):3-8.

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

Scully C, Field JK, Tanzawa H, Shahnava SA, Regezi JA, Bradley G, et al. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2000;190(4):407-9.

Simeone A, Mavilio F, Bottero L, Giampaolo A, Russo G, Faiella A, et al. A human homeobox gene specifically expressed in spinal cord during embryonic development. *Nature* 1986;320(6064):763-5.

Shen WF, Detmer K, Mathews CH, Hack FM, Morgan DA, Largman C, et al. Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *EMBO J* 1992;11(3):983-9.

Shimada T, Nakamura H, Yamashita K, Kawata R, Murakami Y, Fujimoto N, et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2000;18(2):179-88.

Shingaki S, Nomura T, Takada M, Kobayashi T, Suzuki I, Nakajima T. Squamous cell carcinomas of the mandibular alveolus: analysis of prognostic factors. *Oncology* 2002;62(1):17-24.

Smith K, Bui TD, Poulsom R, Kaklamanis L, Williams G, Harris AL. Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;81(3):496-502.

Squarize CH, Castilho RM, Pinto Jr, DS. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 2002;31(7):379-84.

Strong EW. Carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Clin North Am* 1979;12(1):107-14.

Sugerman PB, Joseph BK, Savage NW. Review article: The role of oncogenes, tumour suppressor genes and growth factors in oral squamous cell carcinoma: a case of apoptosis versus proliferation. *Oral Dis* 1995;1(3):172-88

Suwinski R, Sowa A, Rutkowski T, Wydmanski J, Tarnawski R, Maciejewski B. Time factor in postoperative radiotherapy: a multivariate locoregional control analysis in 868 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56(2):399-412.

Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 2003;94(7):593-7.

Thomson PJ, Soames JV, Booth C, O'Shea JA. Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression. *Cell Prolif* 2002;35 Suppl 1:110-20

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

Tsukuda M, Ooishi K, Mochimatsu I, Sato H. Head and neck carcinomas in patients under the age of forty years. *Jpn J Cancer Res* 1993;84(7):748-52.

Tucci, R. Expressão do RNA mensageiro do Gene HOXB5: Relação com a classificação TNM e gradação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Uraguchi M, Morikawa M, Shirakawa M, Sanada K, Imai K. Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Dent Res* 2004;83(4):327-32.

Uusitalo M, Heikkila M, Vainio S. Molecular genetic studies of Wnt signaling in the mouse. *Exp Cell Res* 1999;253(2):336-48.

Vider BZ, Zimmer A, Chastre E, Gespach C, Halperin M, Mashiah P, et al. Deregulated expression of homeobox-containing genes, HOXB6, B8, C8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272(2):513-8.

Vider BZ, Zimmer A, Hirsch D, Estlein D, Chastre E, Prevot S, et al. A. Human

colorectal carcinogenesis is associated with deregulation of homeobox gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232(3):742-8.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993;9(4):138-41.

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

Waltregny D, Alami Y, Clausse N, de Leval J, Castronovo V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *Prostate* 2002;50(3):162-9.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002;1(3):279-88.

Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* 2000;53(4):165-72.

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

Yamazaki H, Inoue T, Yoshida K, Tanaka E, Yoshioka Y, Nakamura H, et al. Lymph node metastasis of early oral tongue cancer after interstitial radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(1):139-46.

Zhao Y, Potter SS. Functional specificity of the Hoxa13 homeobox. *Development* 2001;128(16):3197-207.

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D.A.
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL 3671
SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa*****APROVAÇÃO***

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.12.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa n° 566/01, intitulado: "Estudo da expressão de genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca", apresentado pelo(a) pesquisador(a) DR. MARCOS ROBERTO TAVARES, do Departamento de CIRURGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 12 de Dezembro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde n° 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Anexo B - Parcela de cromatograma do gene da beta actina

Anexo C – Parcela de cromatograma do gene WNT5A