CARINA MAGALHÃES ESTEVES DUARTE

Alterações genéticas, epigenéticas e funcionais dos genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca

São Paulo 2015

CARINA MAGALHÃES ESTEVES DUARTE

Alterações genéticas, epigenéticas e funcionais dos genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Duarte, Carina Magalhães Esteves.

Alterações genéticas, epigenéticas e funcionais dos genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca / Carina Magalhães Esteves Duarte ; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2015.

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

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

Versão corrigida.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Genes homeobox. 3. Epigenética. 4. Neoplasias bucais. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título. Duarte CME. Alterações genéticas, epigenéticas e funcionais dos genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: /	/2015		
		Banca Examinadora	
Prof(a). Dr(a)			
Instituição:		Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)			
Instituição:		Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)			
Instituição:		Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)			
Instituição:		Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)			
Instituição:		Julgamento:	

Aos meus pais, *João Bosco e Nea* pelo exemplo de vida e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Aos meus irmãos, *Fabio e Marcelo*, por todo amor e carinho. Amo todos vocês!

Ao meu marido, *Rafael*, por toda cumplicidade e companheirismo que foram fundamentais para conclusão desse trabalho. Amo você!

À minha filha, *Isabela*, por me ensinar o que é amor incondicional e trazer alegria aos meus dias.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Fabio Daumas Nunes** por todos os ensinamentos transmitidos, pela competência e exemplo de honestidade e seriedade na condução do seu trabalho, o que contribuiu tanto para minha formação pessoal quanto a profissional. Serei eternamente grata.

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

À **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, pela gentileza em permitir que utilizasse seu laboratório de Cultivo Celular.

À minha amiga **Maria Fernanda** por todos os conhecimentos divididos, disponibilidade, ajuda e paciência que foram fundamentais na conclusão deste trabalho. Exemplo de pessoa e profissional, a qual tenho muita admiração. Não tenho palavras para agradecer!

À Fávia Caló por toda paciência no início deste trabalho. Pelo exemplo de pessoa e profissional, que são inspiração para mim. Muito obrigada!

Aos queridos amigos, **Douglas** e **Daniella** pela amizade e por todo auxílio. Vocês foram muito importantes para conclusão deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos amigos que ganhei para vida toda, **Gustavo Rabelo**, **Bianca Pulino**, **Carla Siqueira**, **Camila Gallo**, **Ana Claudia Luiz** e **Alessandra Camargo**. Pelos incentivos constantes, pelos momentos de descontração e por toda amizade!

À todos os colegas do laboratório de Patologia Molecular, **Michella**, **Juvani**, **Gabriel**, **Lília e Natália** pelo convívio, respeito e aprendizado durantes estes anos.

À todos os colegas do laboratório de Cultura Celular pelo convívio extremamente agradável e pelo compartilhamento de ideias.

A todos os demais **colegas do curso de Pós-Graduação**, pelos momentos de descontração e pela ótima convivência.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Bucal, em especial à **Edna e Elisa** por toda colaboração.

As secretárias, **Zilda e Neia**, pela paciência e prestatividade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio Pesquisa (processo n° 10/08720-4), viabilizando a realização deste trabalho.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo durante o período de realização desse trabalho.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e incentivaram essa jornada.

"Tudo parece impossível até que seja feito"

Nelson Mandela

RESUMO

Duarte CME. Alterações genéticas, epigenéticas e funcionais dos genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2015. Versão Corrigida.

Os genes homeobox atuam como reguladores da morfogênese e diferenciação celular embrionária, portanto, é evidente a possibilidade de sua expressão anormal estar presente na progressão de tumores. Estudos preliminares em nosso laboratório verificaram a participação de alguns genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca (CEB). Este trabalho teve como objetivo avaliar a amplificação, expressão e o perfil de metilação dos genes HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13, HOXC12 em linhagem celular derivadas de CEB e tecidos frescos tumoral e não-tumoral. Além disso, verificar o efeito da desmetilação na expressão gênica de linhagens celulares que apresentaram genes 100% metilados e a participação das enzimas responsáveis pela metilação do DNA, bem como a expressão das DNAmetiltransferases (DNMT) nos tumores. A análise de amplificação do DNA e expressão de mRNA foi realizada por qRT-PCR. O perfil de metilação foi avaliada pelo sistema PCR Array e a análise proteica das DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e HOXA9 foi verificada por meio de reações imunohistoquímicas. As linhagens celulares SCC4 e SCC9 foram utilizadas para análise de desmetilação com 5-aza-2'-deoxicitidina e a linhagem SCC4 para avaliar os efeitos do aumento de expressão do HOXA9, na proliferação celular por imunocitoquimica para Ki67, migração celular por transwell e apoptose pela avaliação de células positivas no ensaio de TUNEL. Na comparação entre os grupos, o gene HOXA5 apresentou-se amplificado na margem em relação ao tumor; o HOXA9 apresentou nível de metilação aumentada no tumor; o HOXB5 com amplificação maior na margem, com nível de expressão do mRNA aumentada nos tumores, e nível de metilação do tumor maior em relação a margem, sendo correlacionada com menor sobrevida; HOXB13 se apresentou amplificado no tumor em relação a margem, e com nível de metilação maior nos tumores e, HOXC12 com níveis de metilação maior nos tumores em relação a margem. É interessante, que os mesmos genes que tiveram níveis de metilação aumentados nos tumores em relação a margem, também estavam 100% metilados nas linhagens celulares SCC4 e SCC9 e tiveram sua expressão restaurada após o tratamento com 5-aza-2'-deoxicitina. Na avaliação do nível de

expressão das DNMTs nos tumores, a DNMT3b apresentou-se com níveis aumentados em relação a DNMT1 e DNMT3a, e quando avaliado em nível proteico, a DNMT3a pode ser correlacionada com melhor sobrevida. O aumento da expressão do gene *HOXA9* mostrou diminuição da migração celular, porém não alterou a proliferação e apoptose celular. A expressão proteica não apresentou correlação com parâmetros clínicos. Em conclusão, os resultados mostram que os genes homeobox estudados estão pouco metilados nas linhagens celulares e em tecidos de CEB. A amplificação desses genes não é um evento frequente. O gene *HOXA9* é pouco expresso no tumor, e o aumento da sua expressão em linhagens celulares diminui a migração celular.

Palavra-chaves: Carcinoma epidermóide bucal. Genes homeobox Amplificação de genes. Expressão gênica. Epigenética. DNA (Citosina-5-) Metiltransferase.

ABSTRACT

Duarte CME. Genetic, epigenetic and functional alterations of homeobox genes in oral squamous cell carcinoma [thesis]. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2015. Versão Corrigida.

Homeobox genes are important as morphogenetic and embrionary cellular differentiation regulators, therefore there is basis for their abnormal expression in tumor progression. Preliminary studies in our laboratory have shown that homeobox genes are dysregulated in oral squamous cell carcinoma (OSCC). This study evaluates the genomic amplification, mRNA expression and methylation status of HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13, HOXC12 in squamous cell carcinoma derived cell lines, and fresh tumor tissue. Also, analyzes the demethylation effect in gene expression of cell lines with genes showing 100% methylation, and the participation of enzymes responsible for DNA methylation, DNAmetiltransferases (DNMT), in gene and protein expression in tumors. DNA amplification and mRNA expression was analyzed by qRT-PCR. The methylation profile was evaluated by PCR Array System and DNMT1, DNMT3a, DNMT3b and HOXA9 protein expression was verified by immunohistochemistry. SCC4 and SCC9 cell lines were submitted to 5-aza-2'deoxycytidine for demethylation analysis. SCC4 cell lineage was analyzed by immunocytochemistry for Ki67, cell migration by transwell and apoptosis by TUNEL test after increased expression of HOXA9. HOXA5 gene was amplified in the adjacent margin when compared with the tumor; HOXA9 showed increased level of methylation in tumor; HOXB5 showed amplification in the margin, increased mRNA expression in tumors, increased methylation level and was correlated with decreased survival; HOXB13 was amplified in tumor samples when compared to the margins and also higher methylation level in tumors; and HOXC12 also showed increased methylation levels in tumors when compared to margin. Interestingly, the same genes with increased methylation levels in tumors, were also 100% methylated in cell lines SCC4 and SCC9. The expression of these gens was restored after treatment with 5-aza-2'deoxycytidine. DNMT3b presented higher levels of protein expression relative to

DNMT1 and DNMT3a. DNMT3a protein expression was correlated with improved survival. SCC4 cells overexpressing *HOXA9* gene showed decreased cell migration, with no effect on cell proliferation and apoptosis. HOXA9 protein expression was not correlated with clinical parameters. In conclusion, the results shows that homeobox genes are methylated in some OSCC cell lines and tissues. Amplification of these genes is not a frequent event. *HOXA9* gene has low expression in OSCC, and when overexpressed in cell lines decreases cell migration.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma Epigenetics. Homeobox genes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 Esquema de distribuição do tratamento em duas linhagens celulares (linhagem A: SCC4 ou SCC15; linhagem B: SCC9 ou SCC25) com três concentrações diferentes de agente desmetilante realizado em triplicata. Os círculos azuis representam os poços que receberam as células sem tratamento, utilizadas como controle, os círculos vermelhos representam os poços com 0,5uM de agente desmetilante, os verdes representam os poços com 2,5uM de agente desmetilante e os amarelos receberam 5uM de agente desmetilante)

Figura 5.5 - Imagens representativas das marcações imuno-histoquímicas para o anticorpo HOXA9. Em A, observamos epitélio não tumoral mostrando marcação predominante nas células basais e parabasais do epitélio de revestimento. Em B, observamos área de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado mostrando marcação citoplasmática na maioria das células neoplásicas. Aumento inicial de 100x em A e B.....82

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 -Distribuição do número de cópias para o gene *HOXA5* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,0024......51
- Gráfico .5.2 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,32) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA5*......51
- Gráfico 5.3 -Distribuição do número de cópias para o gene *HOXA7* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,91......52
- Gráfico 5.4 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,42) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA7*......52
- Gráfico 5.6 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,37) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA9*......53
- Gráfico 5.8 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,32) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB5*......54
- Gráfico 5.9 -Distribuição do número de cópias para o gene *HOXB13* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,0005......55
- Gráfico 5.10 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,64) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB13*......55

- Gráfico 5.14 -Distribuição *box plot* dos valores da mediana da expressão normalizada para o gene *HOXA9* em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,3591.....60
- Gráfico 5.15 -Distribuição *box plot* dos valores da mediana da expressão normalizada para o gene *HOXB5* em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,0191......61
- Gráfico 5.16 -Distribuição *box plot* dos valores da mediana da expressão normalizada para o gene *HOXC12* em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,2127......61
- Gráfico 5.18 -Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene HOXA5 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens nãotumorais. Teste Mann Whitney p=0,061563

Gráfico 5.19 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA5* (p=0,2056)64

- Gráfico 5.21 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA7* (p=0,4767......65
- Gráfico 5.23 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA9 (p=0,76)*......66
- Gráfico 5.24 -Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene HOXB5 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens nãotumorais. Teste Mann Whitney (p=0,0490)......67
- Gráfico 5.25 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB5* (p=0,03)68
- Gráfico 5.26 -Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene *HOXB13* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney (p=0,0167)69
- Gráfico 5.27 -Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB13* (p= 0,6257)69
- Gráfico 5.28 -Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene *HOXC12* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney (p=0,0012)70
- Gráfico 5.29 -Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXC12* (p=0,4767)70
- Gráfico 5.30 -Expressão relativa (log2) após o tratamento com decitabina dos genes HOXA9, HOXB5 e HOXC12 na linhagem SCC4, e HOXB13 na linhagem SCC9. As células sem tratamento foram utilizadas como controle.......75
- Gráfico 5.31 -Expressão do gene *HOXA9*, normalizada com o gene constitutivo *GAPDH*, na linhagem SCC4 transfectada com o vetor pCMV6 (controle) e dos três clones celulares transfectadas com o vetor pCMV6-*HOXA9* 79

Gráfico 5.32 -Representação gráfica das células positivas para Ki-67. Não houve diferença estatística significante entre os clones SCC4-*HOXA9* e controle SCC4-pCMV6 p=0,08......80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.2 Associação da metilação dos 6 genes homeobox com as características
clínicas-patológicas e desfecho clínico em amostras de carcinoma
epidermóide de boca72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Genes homeobox	23
2.2 Alterações genéticas dos genes homeobox em câncer	24
2.3 Metilação do DNA nas células normais e dos genes homeob	ox no
câncer	27
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Amostras biológicas e linhagens celulares	34
4.1.1 Pacientes	34
4.1.2 Cultivo Celular	35
4.2 Amplificação genômica	35
4.3 Expressão gênica	37
4.4 Metilação do DNA	38
4.5 Ensaio de desmetilação	39
4.5.1 MTT	39
4.5.2 Tratamento com 5-aza-2´-deoxicitidina	40
4.6 Análise imunohistoquímica para as proteinas DNMT1, DNM	T3a e
DNMT3b	41
4.7 Indução da expressão do gene <i>HOXA</i> 9	42
4.7.1 Transfecção	42
4.7.2 Análise de proliferação celular	43
4.7.3 Ensaio de apoptose	44
4.7.4 Ensaio de migração	45
4.8 Imunohistoquímica HOXA9	47
4.9 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	50
5.1 Perfil de amplificação genômica dos genes homeobox	50
5.2 Perfil de expressão de mRNA dos genes homeobox	59
5.3 Perfil de metilação dos genes homeobox	62

5.3.1 Ensaio de desmetilação	74
5.3.2 Imunohistoquímica DNMT1, DNMT3a, DNMT3b	75
5.4 Indução da expressão do gen HOXA9	78
5.4.1 Efeito da indução da expressão do gene HOXA9 sobre a prolife	eração
celular	79
5.4.2 Efeito da indução da expressão do gene HOXA9 sobre a migração d	celular
	80
5.4.3 Efeito da indução da expressão do gene HOXA9 sobre a apoptose o	celular
	81
5.5 Análise imunohistoquímica do HOXA9 em carcinoma epidermói	de de
boca	81
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	106

1 INTRODUÇÃO

Vários estudos têm revelado numerosas alterações moleculares tumorespecíficas nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo o de boca, como a ativação de oncogenes¹, a inativação de genes supressores de tumor², a perda da heterozigose em vários sítios cromossômicos³ e amplificação gênica, que resulta no aumento do número de cópias de um gene e frequentemente resulta no aumento de expressão de oncogenes e leva a instabilidade cromossomica⁴.

Durante o projeto transcriptoma realizado no Brasil em 2001, buscou-se identificar transcritos de uma série de genes expressos no câncer de cabeça e pescoço⁵. Entre eles estavam presentes transcritos de uma família de genes, os homeobox, que funcionam como fatores de transcrição, ligando-se ao DNA de modo seqüência-específica^{6,7}.

Estudos preliminares do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, na busca de transcritos dos genes homeobox que pudessem revelar marcadores de prognóstico e agressividade em CEB, realizaram análise por *microarray* e observaram aumento da expressão dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4*, bem como a diminuição da expressão do *PROX1* e *ZHX1*, sendo a maior expressão do *HOXD10* associado com CEB de menor agressividade e o *PROX1* como supressor tumoral na carcinogênese oral ⁸. Outros estudos realizados, associaram a baixa expressão do *HOXA5* com pior prognóstico ⁹, e expressão aumentada do *HOXB5* na maioria dos CEB ¹⁰.

Embora inicialmente fosse considerado que apenas a regulação positiva dos genes homeobox promovesse carcinogênese, tem se tornado evidente que a perda da expressão desses genes também está associada com este processo¹¹, sendo que o controle epigenético é um mecanismo comum que integra o controle da expressão de genes homeobox. Portanto, realizou-se um estudo piloto em linhagem celular derivada de CEB, afim de verificar o perfil de metilação dos genes *HOX*, utilizando o método Human Homeobox Genes EpiTect Methyl qPCR Arrays. O padrão de aumento de metilação e baixa metilação foi similiar nos clusters *HOXA* e *HOXB*, sendo que o *HOXB*,

especialmente *HOXB4*, foram correlacionadas com a diminuição da expressão de transcritos e tiveram a expressão restaurada após tratamento com 5-azadeoxicitidina¹².

Atualmente, a importância da hipermetilação de genes no câncer está bem estabelecida, refletindo no surgimento de plataformas de buscas como o PubMeth (http://www.pubmeth.org) e alguns genes HOX foram identificados nessa plataforma como metilados em diferentes neoplasias, sendo estes HOXA9, HOXB5 e HOXB13, sendo apenas a metilação do HOXA9 associado ao CEB¹³. Estudos utilizando técnica de mapeamento baseado em arranjo de DNA e amplificação por microarrray de ilhas CpG metiladas identificaram uma série de novos biomarcadores de metilação, dentre eles os genes HOXD10 e HOXC12 em linfoma folicular¹⁴. Contudo, os mecanismos envolvidos no processo de hipermetilação da região promotora de genes homeobox ainda precisam ser compreendidos, tornando importante estudos direcionados para participação das DNMTs, que são enzimas responsáveis pela metilação, e que podem estar relacionada com metilações aberrantes tipicamente encontradas em câncer¹⁵. Existem três tipos de DNMTs descritas na literatura: DNMT1, que mantém o padrão de metilação; DNMT3a e DNMT3b que são responsáveis por novas metilações.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil genético e epigenético dos genes homeobox, *HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12*, e interação com as enzimas DNMTs, que são responsáveis pela metilação, correlacionando os dados obtidos com as características clinico patológicas bem como a sobrevida do paciente. Adicionalmente serão avaliados os efeitos do aumento de expressão do gene *HOXA9* em linhagem celular derivada de CEB em alguns mecanismos associados com a transformação maligna, incluindo proliferação, apoptose e migração celular e, avaliação da expressão proteica em tecidos de CEB.

2.1 Genes homeobox

Os genes homeobox foram primeiramente descritos na *Drosophila melanogaster* como genes homeóticos responsáveis pela segmentação ânteroposterior nas fases iniciais da embriogênese, contribuindo fortemente para a correta localização das estruturas corporais¹⁶. O termo homeose é usado para descrever a transformação de uma estrutura do corpo em uma estrutura homóloga de outro segmento corporal. Na mutação do gene *Antenappedia* na Drosophila, por exemplo, há formação de patas no lugar das antenas¹⁷.

Em humanos, os genes homeobox são divididos em dois grupos: a família agrupada *HOX* ou classe I dos genes homeobox, e os genes não agregados ou classe II dos genes homeobox. As proteínas da família *HOX*, são codificados por 39 genes organizados em 4 clusters (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC*, *HOXD*), e estão localizados nos cromossomos 7,17,12 e 2, respectivamente¹⁸. Os genes *HOX* possuem uma grande homologia com os genes homeóticos HOM-C da *Drosophila melanogaster*, que está localizado em dois genes, a Antennapedia (Ant-C) e complexo bithorax (BX-C)¹⁹. Sabe-se que os genes expressos posteriormente (localizados na extremidade 3') geralmente impõe sua função mais que os genes expressos anteriormente (localizados na extremidade 5') através de um mecanismo de supressão que não envolve a repressão da transcrição¹⁸. Os genes não-agrupado são genes homeobox mais numerosos (cerca de 160 no genoma humano) e estão dispersos por todo o genoma e não estão envolvidos em transformações homeóticas^{19,20}.

A família dos genes homeobox agem com reguladores da morfogênese e diferenciação celular durante a embriogênese^{6,21} e adicionalmente, participam da manutenção no adulto da identidade celular²². Os genes homeobox possuem uma sequência comum altamente conservada de 180bp que codifica 60

aminoácidos conhecido como homeodomínio. As proteinas do homeodomínio agem como fatores de transcrição que se ligam ao DNA primariamente por meio de núcleos de repetição (motifs) caracterizados pela seqüência TAAT, regulando a expressão de genes alvos envolvidos no processo de adesão celular, proliferação e diferenciação.

Recentemente, a expressão alterada dos genes homeobox tem sido associada a diferentes tumores sólidos incluindo mama, bexiga, pulmão, próstata e de boca^{6,23,24}. A expressão aberrante dos genes homeobox em câncer incluem em três categorias: primeira, estes genes podem ser reexpressos em células tumorais e em condição normal são expressos somente durante o desenvolvimento; Segundo, os genes homeobox podem ser expressos somente em células tumorais, mas não estão normalmente expressos durante o desenvolvimento; e terceiro, os genes homeobox podem ter baixa expressão em células malignas derivadas de tecidos em que estes genes estão normalmente expressos durante a diferenciação celular em adulto⁶. Mais importante, os genes homeobox mostram um comportamento tecido-específico e podem promover a tumorigênese como consequência do ganho ou perda da função que podem levar a efeitos inapropriados de crescimento e diferenciação celular.

2.1 Alterações genéticas dos genes homeobox em câncer

As características biológicas do câncer são determinadas por alterações genéticas nas células tumorais, o que pode representar informações para auxiliar a terapêutica e predição do prognóstico do paciente¹³. O primeiro estudo correlacionando a alteração do gene homeobox com câncer, foi realizado em 1987, a fim de mostrar o conhecimento sobre a função do gene *HOX 1.1* ou *HOXA7* através da expressão do seu produto, a proteína *HOX 1.1*. A indução dessa proteína foi associada não só com a diferenciação de células de carcinoma embrionário, mas também com as fases do crescimento celular²⁵.

Desde então. vários estudos realizados em linhagens celulares hematopoiéticas²⁶⁻²⁸, renal²⁹, neuroblastoma³⁰, fígado³¹, mama³², melanoma³³, próstata³⁴ mostraram o padrão alterado de expressão dos genes homeobox. A partir de 1993, iniciaram-se os estudos em tecido, como o realizado por De Vita et al. ³⁵, que mostraram alteração de expressão do genes HOX em câncer colorretal e com metástase hepática, sugerindo associação com a progressão do câncer de colon. Rieger et al.³⁶ estudaram a expressão do gene HOXC4 em queratinócitos normais de pele e tumores epiteliais de pele em adultos. Os resultados sugeriram que HOXC4 é expresso principalmente nos queratinócitos diferenciados e que a falta de diferenciação, como em células neoplásicas, é acompanhada por regulação negativa da expressão desse gene.

A partir da última década, mais precisamente em 2004 começou-se a correlacionar alteração de expressão dos genes homeobox com o carcinoma epidermóide de boca. Estudo descrito por Zhu et al.³⁷, avaliaram a expressão de transcritos do gene *Quox-1* em epitélio bucal normal, displásico e em carcinoma epidermóide bucal. O gene foi considerado um fator preditivo para proliferação maligna, uma vez que os resultados obtidos neste estudo revelaram que o tecido epitelial normal não expressa o gene *Quox-1*, sendo que sua expressão aumenta de acordo com a progressão da displasia.

Estudo realizado por Hassan et al. ³⁸ avaliaram a expressão dos genes HOX em displasias e em carcinoma epidermóide bucal. Os genes HOXA2, HOXB2, HOXD3, HOXD4, HOXD8 e HOXD9 apresentaram maiores níveis de expressão quando comparado com os demais genes HOX em amostras de mucosa oral normal. Os tecidos displásicos demonstraram níveis reduzidos de expressão dos genes HOXA1, HOXB7, HOXB9 e HOXC8 em relação às amostras de carcinoma oral, podendo o aumento de expressão destes genes estar associada à transformação de condições cancerizáveis da cavidade oral. A expressão anormal de genes HOX, dentre eles HOXA5, HOXA9, HOXC13, HOXD10 e HOXD11, foi observada em displasia epitelial e carcinoma epidermóide de boca, existindo maior expressão na neoplasia em comparação ao tecido não-tumoral. Com isso, os autores sugerem um perfil de expressão específico para cada gene HOX, e que estes estão envolvidos na carcinogênese de boca. Mais recentemente, em 2011, um estudo publicado pela equipe do nosso laboratório, investigou a expressão do *HOXB5* em carcinoma epidermóide de boca e tecido não tumoral adjacente, a fim de verificar seu papel associado ao tumor, assim como com as características clínicas e histopatológicas. Os resultados mostraram aumento da expressão do gene *HOXB5* em 93,3% dos carcinomas epidermóides de boca, concluindo que este gene desempenha um papel importante no desenvolvimento dessa neoplasia e deve ser investigado¹⁰.

No ano seguinte, em 2012, Rodini et al.⁹ analisaram a expressão de transcritos de genes homeobox por *microarray* em amostras de carcinoma epidermóide bucal e em tecido adjacente não-tumoral, bem como em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca. A análise de dados do *microarray* revelou a expressão de 147 genes homeobox, sendo 6 deles, com aumento de expressão e outros, 34 genes com baixa expressão. Após o ensaio por qPCR, os genes *HOXA5*, *HOXD10* e *HOXD11* apresentaram níveis de expressão elevados, estatisticamente significante, em relação ao tecido não-tumoral adjacente. Os pacientes que apresentaram baixa expressão do gene *HOXA5* foi correlacionada com pobre prognóstico quando comparados com aqueles que tiveram alta expressão desse gene.

A amplificação gênica também tem se mostrado um evento frequente em vários tipos de tumor, conduzindo muitas vezes para o aumento da expressão e contribuindo para iniciação e progressão do câncer. Estudos moleculares mostraram amplificação da região 11q13 em câncer de cabeça e pescoço³⁹, porém apenas um estudo foi realizado especificamente em câncer de boca, envolvendo entre outros mecanismos, a amplificação gênica. Em 2014, a fim de verificar os mecanismos envolvidos na tumorigênese em boca regulados pelo *PROX1*, os níveis de expressão proteica e mRNA, perfil de metilação e amplificação desse gene foram estudadas em amostras de tecido de CEB e tecido adjacente por Rodrigues et al.⁸, e os resultados foram promissores, apontando o gene *PROX1* como supressor tumoral na carcinogênese oral.

A perda de função desses genes causada por mutação, deleção, ou perda de heterozigose, apesar de serem fenômenos genéticos conhecidos no câncer, parecem não ser os únicos mecanismos para o silenciamento dos genes homeobox⁴⁰. Por outro lado, as alterações epigenéticas por metilação do DNA tem se mostrado uma via alternativa que contribui nesse processo⁴¹.

2.2 Metilação do DNA nas células normais e dos genes homebox no câncer

Desde 1940, quando Conrad Waddington descreveu pela primeira vez a epigenética, descobertas sobre sua implicação em células normais e na biologia de doenças não pararam, somando um enorme conhecimento na última década. Portanto, para entender o papel da metilação no câncer, torna-se necessário entender seu papel biológico nas células normais. A metilação do DNA é caracterizada pela modificação da mólecula pela adição do grupo metil no nucleotide citosina em regiões específicas do DNA por meio da enzima DNAmetiltransferase (DNMT)⁴². Há três tipos de DNMT descritas na literatura: DNMT1, que mantém o padrão de metilação através da replicação do DNA; DNMT3a e DNMT3b reponsáveis pela metilação "de novo" em regiões ricas em CpGs previamente não metiladas. Em torno de 3 a 6% de todas as citosinas estão metiladas no DNA humano normal, sendo que os dinucleotídeos CpG que possuem potencial de metilação não estão distribuidos aleatoriamente no genoma humano, estão concentrados nas regiões ricas em ilhas CpGs, mas especificamente na região 5' (promotora, exon 1) de muitos genes, e usualmente não estão metiladas em células normais43. O padrão de metilação e desmetilação dos genes resultam em um processo dinâmico que determina a estrutura da cromatina, ou seja, um gene no estado metilado está associado com a cromatina inativa e em estado desmetilado está associado com a cromatina ativa44.

Em mamíferos, a metilação do DNA é essencial no desenvolvimento embrionário, expressão gênica, silenciamento de transposons e defesa contra sequências virais⁴⁵. Também desempenha um papel importante durante o desenvolvimento de alguns fenômenos, como inativação do cromossomo X e *imprinting* genômico⁴⁶. Muitos genes "impritados" estão envolvidos em processos celulares como crescimento celular, sinalização, ciclo celular e embriogênese ⁴⁷. A desmetilação do DNA, essa pode ocorrer por meio de dois mecanismos: ativo ou passivo. A desmetilação do DNA ativa é caracterizada por um processo

enzimático que resulta na remoção do grupo metil da 5-metilcitosina (5-meC) pela quebra da ligação carbono-carbono. Por outro lado, a desmetilação passiva refere a perda do grupo metil da 5meC quando a DNMT1 é inibida ou ausente durante a replicação⁴⁸.

Em resumo, as alterações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA são importantes nos processos de transcrição, replicação e reparo do DNA. Estes mecanismos trabalham de forma sinérgica para estabilizar e manter o estado condensado ou descondensado da cromatina, determinando o padrão de expressão gênica.

Os defeitos epigenéticos envolvidos no câncer incluem hipometilação genômica global e hipermetilação locus-específica de ilhas CpG. Essas alterações, por sua vez, levam à instabilidade genômica⁴⁹. Outros mecanismos de hipermetilação já foram propostos, incluindo (1) hipermetilação por aumento da expressão da DMNT, (2) ganho de metilação secundário à maior expressão de repressores transcricionais, (3) ganho de metilação secundário à perda de ativadores transcricionais e, (4) transferência interalélica de metilação por pareamento gênico⁵⁰. No primeiro modelo de hipermetilação, a hipótese que a atividade de DNMT esteja aumentada no câncer permanece desconhecida^{51,52}.

Os genes homeobox agem como fatores de transcrição pela ligação específica de DNA e as ilhas CpGs na região promotora desses genes estão frequentemente metilados⁵³. Em muitos tipos de cancer, a inibição dos genes homeobox por hipermetilação da ilhas CpGs podem contribuir para inativação de genes regulatórios ou de reparo do DNA, consequentemente contribuindo para a carcinogênese como descrito na figura 2.1.



Figura 2.1 - Esquema demonstrando que o silenciamento da expressão dos genes homeobox pela metilação da região promotora contribui para a carcinogênese por meio de diversos eventos

O primeiro estudo correlacionando a metilação do gene homeobox e câncer foi em 1996, publicado por Flagiello et al.⁵⁴, realizado por xenoenxerto de linhagem celular derivada câncer de pulmão de pequenas células em rato. Desde então, a metilação dos genes homeobox foram correlacionados com 11 tipos de cânceres sólidos, sendo o câncer de mama o mais estudado, conferindo resistência a antiestrogêno quando o gene homeobox C10 (HOXC10) apresentase hipermetilado⁵⁵, boa resposta ao tamoxifeno em pacientes pós-menopausa com hipermetilação do gene paired-like homeodomain 2 (PITX2)56, alta receptores de estrogênio e progesterona através da expressão de hipermetilação dos genes homeobox A10 (HOXA10) e homeobox B13 (HOXB13)⁵⁷. Além disso, outro estudo sugere que a hipermetilação do HOXB13 também está implicada na tumorigênese de eventos tardios do câncer mama e pode ser considerado como um indicador de pior prognóstico com presença de metástase linfonodal⁵⁸. Em câncer colorretal, vários estudos mostraram a baixa regulação de expressão do gene caudal type homeobox 1 (CDX1) por hipermetilação⁵⁹⁻⁶² e foi sugerido por Zhang et al.⁵⁹ a hipótese que a indução do estresse oxidativo ROS silencia o gene por regulação epigenética, pode estar associado com a progressão tumoral. Assim como o CDX1, o gene caudal type homeobox 2 (CDX2) também tem sido considerado um gene importante no desenvolvimento do câncer coloretal, pois sua expressão está ausente pela hipermetilação no tumor, mas está preservada em adenoma⁶³.

Em câncer de pulmão, Selamat et al.⁶⁴ afirmam que o evento epigenético ocorre na transição da hiperplasia, carcinoma *in situ* e câncer invasivo de pulmão. As ilhas CpGs do homeobox A1 (*HOXA1*) e homeobox A11 (*HOXA11*) estão significativamente hipermetilados no adenocarcinoma *in situ*, contribuindo com a progressão do câncer. Dietrich e colaboradores⁶⁵ afirmaram que a hipermetilação do gene short stature homeobox 2 (*SHOX2*) e *PITX2* foram preditivos para sobrevida livre de progressão e pacientes com hipometilação desses genes mostraram alto risco de progressão tumoral.

No câncer de óvario, a hipermetilação de alguns genes parecem desempenhar um papel importante na carcinogênese, como a metilação dos genes homeobox A9 (*HOXA9*) e engrailed homeobox 1 (*EN1*) que discriminam entre tumor benigno e maligno com sensibilidade de 98.8% e especificidade de 91.7%⁶⁶. Adicionalmente, outros genes como homeobox genes LIM homeobox transcription factor 1, alpha (*LMX1A*) e *HOXA10* também estão silenciados pela hipermetilação e correlacionados com a progressão tumoral, o que podem ser considerados fatores de prognóstico importante no câncer de ovário^{67,68}.

No câncer gástrico, três genes homeobox se destacam em estudos epigenéticos, como homeobox D10 (*HOXD10*) que apresenta-se com baixa expressão no câncer gástrico quando comparado ao tecido normal do estômago. Funcionalmente, a reexpressão do *HOXD10* resulta na inibição da progressão celular, indução da apoptose e diminuição da migração e invasão celular⁶⁹. Outros genes, incluindo *CDX2* e pancreatico e duodenal homeobox 1 (*PDX1*), que agem como supressores tumorais estão silenciados transcricionalmente pela hipermetilação, promovendo a progressão tumoral no câncer gástrico^{70,71}.

No câncer de próstata, as ferramentas mais utilizadas para prever resultados de câncer de próstata consistem em nomogramas clínicos e patológicos como PSA, estadiamento clínico e escore de Gleason⁷². Porém, o comportamento biológico do câncer de próstata grau intermediário pode exibir um comportamento mais agressivo, portanto identificar novos biomarcadores que permitem a detecção e prognóstico do câncer de próstata é fundamental. A hipermetilação do gene even-skipped homeobox 1 (*EVX1*), que está epigeneticamente alterado, pode ser útil como marcador biológico, diferenciando tumores de alto grau do nível intermediário, uma vez que os tumores que apresentaram esse gene hipermetilado tiveram um pior prognóstico⁷³.

Outros tumores menos estudados como o câncer de bexiga, conferiram a hipermetilação do T-cell leukemia homeobox 3 (*TLX3*) resistência a terapia antineoplásica, mas especificamente a cisplatina⁷⁴. Nos casos de câncer de glioma, os genes Homeobox A3 (*HOXA3*), homeobox A7 (*HOXA7*), *HOXA9* e *HOXA10* estão metilados em tumores de alto grau e, a hipermetilação dos genes *HOXA9* e *HOXA10* foram considerados como fatores de prognóstico em pacientes com glioblastoma⁷⁵. No câncer de pâncreas, apenas um gene homeobox foi identificado com alteração epigenética, que é o caso do gene HOP homeobox (*HOPX*), que está consistentemente hipermetilado, o que poderia explicar o fenótipo agressivo do câncer de pâncreas⁷⁶. E por fim, no câncer de cabeça e pescoço, apenas o câncer esofágico e de boca possuem estudos publicados com alteração de metilação do DNA. No câncer esofágico, a perda de expressão do *CDX2* pela hipermetilação leva a perda do Mucin-2 (*MUC2*) e contribui na redução do efeito protetor da mucina nas células epiteliais. Dada a associação de desenvolvimento de carcinoma epidermóide esofágico diretamente com a injúria da mucosa, esta inativação pode ser importante na carcinogênese de tumores esofágicos. Os autores sugerem que a inativação do câncer esofágico⁷⁷. Quanto ao carcinoma epidermóide de boca, apenas um estudo foi publicado, correlacionando a metilação do gene *HOXA9* com aumento da metástase cervical⁷⁸.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo investigar o perfil genético e epigenético dos genes homeobox *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXB5*, *HOXB13* e *HOXC12* em CEB e amostras de tecido não tumoral adjacente, correlacionando com o perfil genético e proteico das DNMTs, e adicionalmente, avaliar por ensaios funcionais o efeito do aumento da expressão do gene *HOXA9* em linhagem celular.

Especificamente, pretende-se:

a) Amplificar os genes homeobox HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12 utilizando a técnica de PCR em tempo real para análise genômica diferencial do número de cópias dos genes em amostras de carcinoma epidermóide de boca e tecido não tumoral correspondente e, relacionar com aspectos clinico patológicos e de sobrevida;

b) Realizar análise de metilação do DNA através do sistema *Methyl-Profiler*[™] *DNA Methylation PCR Array System* para os genes homeobox *HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13* e *HOXC12,* em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de boca (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) e em amostras de carcinoma epidermoide de boca e tecido não tumoral correspondente e, verificar a importância clinico patológica e de sobrevida;

c) Verificar a expressão dos genes HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13, HOXC12
em amostra de carcinoma epidermóide de boca e tecido não tumoral pela técnica
de PCR em tempo real,

d) Verificar a expressão dos genes *DNMT1, DNMT3a* e *DNMT3b* em amostras de carcinoma epidermóide bucal pela técnica de PCR em tempo real;

 e) Avaliar o efeito da desmetilação de genes homeobox que apresentarem o perfil de metilação de 100% na linhagem celular correspondente, e avaliar a expressão por meio da técnica de PCR em tempo real;

f) Induzir a expressão do gene HOXA9 na linhagem derivada de carcinoma epidermóide de boca (SCC4) e analisar a capacidade de proliferação por

imunocitoquímica para Ki67, apoptose pela técnica de TUNEL e migração celular por ensaio de *transwell;*

j) Avaliar a expressão proteica do gene *HOXA9* em amostras de carcinoma epidermóide de boca, por imunohistoquímica e correlacionar com os dados clinico patológicos e de sobrevida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras biológicas e linhagens celulares

4.1.1 Pacientes

Foram utilizadas 30 amostras de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, tabagistas, com idade igual ou superior a 40 anos e de ambos os sexos. As amostras foram resgatadas do banco de amostras do Grupo Genoma de Cabeça e Pescoço (GENCAPO), macrodissecadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido referente a cada Instituição de origem (Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital Heliópolis), tendo sido previamente submetidos e aprovados pelo CONEP (parecer nº 1763/2005) e aprovação do Comitê de Ética pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (parecer nº 181/2010) que encontrase no (Anexo A).

Após a confirmação histológica de CEB, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores, todos os tecidos contendo pelo menos 70% de células tumorais foram incluídas no estudo e os tecidos epiteliais morfologicamente livres de tumor representando as margens adjacentes também foram utilizados nas comparações.

O GENCAPO foi responsável por coletar as amostras, pela análise inicial, coleta dos dados clínicos, análise histológica e obtenção do consentimento livre e esclarecido de cada paciente. Os dados clínicos obtidos incluem idade, sexo e história de consumo de álcool e tabaco. Os dados da peça cirúrgica incluem localização e tamanho da lesão, comprometimento linfonodal, estadiamento patológico, diferenciação histológica, infiltrado inflamatório, e infiltrações perineural, vascular sanguínea, vascular linfática e sobrevida.

As linhagens celulares de carcinoma epidermóide de SCC4 (CRL-1624), SCC9 (CRL-1629), SCC15 (CRL-1623) and SCC25 (CRL-128) da American Type Cell Culture Colection (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75cm2 (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura DMEN/F12 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona – Eurofarma, Brasil) e solução antimicótica e antibiótica 1% (Sigma). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO2 e 95% de umidade até uma confluência de 60-70%. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular.

4.2 Amplificação genômica

Os tecidos de carcinoma epidermóide oral e as margens adjacentes foram processadas para extração do DNA genômico utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Cat in 51306, QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. Esta etapa foi realizada pela Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier.

O DNA genômico extraído serviu de molde para amplificação por qPCR (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando fluoróforo SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). As sequências de iniciadores foram desenhadas utilizando o programa Primer Express v2.0 para os genes de interesse, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXB5*, *HOXB13*, *HOXC12*, e para o gene de expressão constitutiva *ZNF80*, de forma que apresentaram uma temperatura de associação entre 60 e 62°C e geraram produtos de tamanho idealmente entre 50 e 150pb (Tabela 4.1). Todas as reações foram realizadas em um volume final de 10 μL em tubos óticos com os seguintes reagentes: primers sense e antisense, Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA e
água RNAse/DNAse free. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação.

A análise quantitativa foi realizada de acordo com Terribas et al.⁷⁹. Resumindo, foi calculado o valor ΔCq (diferença de CT entre amostra calibradora e desconhecida). A quantidade relativa foi calculada através da equação RQ=E^{-ΔCq} e a quantidade relativa normalizadora (QRN) como QRN=RQ^{gene alvo}/RQ^{ZNF80}. Depois foi calculado o número relativo de cópias (NRC) como NRC=QRN/FE, sendo FE o fator de escalonamento, que representa a media aritmética dos valores QRN de 17 tecidos de mucosa oral normal contendo 2 cópias do gene de estudo. NRC próximo ou igual a 1 refere a presença de 2 cópias do gene de estudo e NRC acima de 1 indica amplificação gênica positiva.

Tabela 4.1 - Sequência e orientação dos iniciadores utilizados para amplificação genômica por qPCR, segundo o gene, número de acesso no Gene Bank e temperatura de dissociação (Tm).

GENE		INICIADORES (5´3´)						
	ACESSSO	SENSO	ANTI-SENSO	(ºC)				
HOXA	5 NC_000007.14	aactcattttgcggtcgctat	ttatgcaactggtagtccggg	60				
HOXA	7 NC_000007.14	tcaacagccccctttatcag	gactgcgcctacctgaagac	60				
HOXAS	9 NG_029923.1	agaggacagagtaggagaaagg	ggttaggaaaggcagtcagg	62				
HOXB	5 NC_000017.10	tccttctcggggcgttatc	gccactgccataatttagcaac	62				
HOXB1	3 NC_000017.10	agctcccgtgccttatggtta	ggctggtaggttcccggata	60				
HOXC1	2 NC_000012.11	cagcaggaggtagggttgag	aaagggtgaccagtccagt	62				
ZNF80	NC_000003.12	ctgtgacctgcagctcatcct	taagttctctgacgttgactgatgtg	60				

4.3 Expressão gênica

A análise da expressão gênica foi realizada para os seis genes homeobox HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12 em amostras de CEB e margem adjacente. Essa análise foi também realizada nas linhagens celulares SCC4 e SCC9 para avaliar o efeito da desmetilação após o tratamento com 5aza-deoxicitidina para os genes HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12 (item 4.5) e por fim, na linhagem SCC4 para avaliar a indução da expressão do gene HOXA9 após a transfecção (item 4.7.1).

O RNA total das amostras de CEB e margem adjacente, assim como das linhagens celulares foi extraído pela técnica do isoticianato de guanidina usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, seguido da síntese de cDNA com High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) no volume final de 20ul partindo-se de 1ug de RNA. Para síntese de cDNA, as amostras foram incubadas em termociclador (Termociclador Metercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetidos a 25°C por 10 minutos seguido de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos, e depois armazenados em freezer -20°C. Os produtos da transcriptase reversa (RT) serviram de molde para amplificação por qPCR, que foram realizadas utilizando o termociclador Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). As reações realizadas tiveram um volume final de 10ul em tubos ópticos com os seguintes reagentes: 5ul Green Master Mix® (Applied Biosystem), 1ul cDNA, água DEPC, primer sense e antisense dos genes de estudo (HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12) e constitutivo GAPDH (conforme descritos na tabela 4.2). O processo de ciclagem térmica constituiu em desnaturação por 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 10 segundos a 95°C e um minuto a 60°C ou 62°C, dependendo do primer utilizado. Para cada gene, a análise da curva de dissociação foi realizada no final de cada ciclagem para confirmar a amplificação e evitar a presença de dímeros. Para cada par de primers foi realizada a reação de qPCR com água DEPC (blank) para avaliação de possível contaminação. Os primers utilizados foram desenhados utilizando-se o programa Primer Express v2.0 e estão descritos na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Sequência e orientação dos iniciadores utilizados para expressão de mRNA por qRT-PCR, segundo o gene, número de acesso no Gene Bank e temperatura de dissociação (Tm).

	NÚMERO DE	INICIADORES (5´3´)						
GENE	ACESSSO	SENSO	ANTI-SENSO	(ºC)				
HOXA5	NM_019102.1	cccgcccaacccagatc	gcgggtcaggtaacggttg	60				
HOXA7	NM_006896.3	tcgtattatgtgaacgcgctt	ggctcggcattttggaacag	60				
HOXA9	NM_152739.3	agaatgagagcggcggagacaa	ctctttctccagttccagggtc	60				
HOXB5	NM_002147.3	tccttctcggggcgttatc	gccactgccataatttagcaac	62				
HOXB13	NM_006361.5	gagcgccagattaccatctggt	ccaggacaccccactttcgc	60				
HOXC12	NM_173860.1	atgggcgagcataatctcctg	cgtgggtaggacagcgaag	62				

4.4 Metilação do DNA

A análise quantitativa de metilação do DNA para os genes HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13, HOXC12 nos tumores, margens adjacentes e nas linhagens celulares foi realizada por meio de qPCR utilizando o sistema Methyl-Profiler[™] DNA Methylation PCR Array System (SABiosciences Corporation, Frederick, MD, USA). A detecção de metilação de ilhas CpG de genes específicos foi obtida por meio de digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação (genes metilados não foram digeridos), e com enzimas dependentes de metilação (genes metilados foram digeridos) e digestão com ambos os tipos de enzimas (controle de background). O tratamento enzimático ocorreu por 18h a 37°C. Após a inativação enzimática a 65°C por 20 minutos, o DNA foi amplificado por qPCR usando iniciadores que flanqueiam a região de interesse, sendo as condições de ciclagens recomendadas pelo fabricante. Após a digestão, o DNA remanescente foi quantificado usando real-time PCR arrays (ABI 7500 Real-time system). O status de metilação foi medido pela porcentagem de DNA inserido metilado como determinado pela EpiTectMethyl DNA methylation PCR data analysis (Qiagen, http://www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_ analysis.php), seguindo

as instruções do fabricante. O perfil de metilação do DNA nas amostras foram divididas em dois grupos baseados nos valores *cut-off:* >50% (hipermetilado) ou <50% (hipometilado).

4.5 Ensaio de desmetilação

4.5.1 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, tetrazolium)

Para análise da viabilidade celular, escolha da melhor concentração e período de tratamento do agente desmetilante 5-aza-2´-deoxicitidina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), as linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 foram plaqueadas no total de 2x10⁴ células/poço em uma placa de 24 poços em 3 concentrações diferentes de 5-aza-2´-deoxicitidina (0,5uM, 2,5uM e 5uM), avaliadas nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h, conforme demostrado na figura 4.1. Após o período de tratamento, foi adicionado 1ml de reagente MTT (Sigma-Aldrich, Pool, UK) com concentração final de 0,5mg/ml de MTT diluído em meio de cultura não suplementado soro fetal bovino e então, as células foram incubadas a 37°C por 4 horas na ausência de luz. Após esse período, o meio de cultura contendo o reagente foi retirado e adicionado 1mL de etanol para precipitação do produto e a placa foi imediatamente analisada a 570nm no espectrofotômetro (ELX800, Bio-Tek Instruments, INC). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Apesar de ter sido realizado nas 4 linhagens celulares, o ensaio de desmetilação foi considerado apenas para as linhagens SCC4 e SCC9, pois foram as que apresentaram genes com 100% de metilação.



Figura 4.1 – Esquema de distribuição do tratamento em duas linhagens celulares (linhagem A: SCC4 ou SCC15; linhagem B: SCC9 ou SCC25) com três concentrações diferentes de agente desmetilante realizado em triplicata. Os círculos azuis representam os poços que receberam as células sem tratamento, utilizadas como controle, os círculos vermelhos representam os poços com 0,5uM de agente desmetilante, os verdes representam os poços com 2,5uM de agente desmetilante e os amarelos receberam 5uM de agente desmetilante

4.5.2 Tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina

Para avaliar o efeito da desmetilação na expressão dos *HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12,* os quais apresentaram-se hipermetilados nas linhagens SCC4 e SCC9 no ensaio descrito no item 4.1. As linhagens SCC4 e SCC9 foram tratadas com o agente de desmetilação 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-dC; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) na concentração de 0,5 uM por 96h. Após esse período, as células foram coletadas para extração do RNA total, análise protéica e análise de expressão gênica. Células sem tratamento foram utilizadas como controle. A análise de expressão está descrita no item 4.3.

4.6 Análise imunohistoquímica para as proteínas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b

Os blocos parafinados foram seccionados (3µm) em micrótomo e os cortes colocados sobre lâminas de vidro silanizadas. As lâminas ficaram

armazenadas em uma estufa a 60°C, permanecendo por um tempo estimado de 2h. A seguir, foi realizada a desparafinização em dois banhos de xilol, o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente, por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 95%, álcool 90% e álcool 85%) durante 5 minutos cada. Após a reidratação, foi realizada a remoção do pigmento formólico por meio de incubação em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% durante 10 minutos. Após essa etapa, seguiu-se lavagem em água destilada. Para recuperação antigênica as lâminas foram emergidas em tampão citrato-fosfato (P4809, pH 6,0; Sigma, St Louis, MO, USA) pH 6,0 e em banho maria à 95°C por 30 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, as lâminas foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio a 20V em metanol (1:1), em 2 banhos por 15 minutos cada. Logo após, foi realizado um tamponamento com 3 banhos de TRIS pH 7,6, por 5 minutos cada e, em seguida, o bloqueio de sítios inespecíficos com solução de PBS/BSA 1% por 1 hora seguidas de duas lavagens com TRIS pH 7,6 por 10 minutos cada. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1%, sendo o anticorpo monoclonal de camundongo Anti-Dnmt3b (IMG-184, Imagenex, San Diego, CA, USA) na diluição 1:100, Anti-Dnmt1 (IMG-261A, Imagenex) na proporção 1:400 e Anti-Dnmt3a (IMG-268A) na proporção 1:200 a 4°C por 18 horas. Posteriormente, os cortes foram incubados com o sistema de detecção ADVANCETM HRP (K4067, Dako), composto de duas etapas de 30 minutos (anticorpo anti-camundongo/anti-coelho ADVANCE™ HRP Link, e anticorpo polimerizado com enzima peroxidase ADVANCE™ HRP Enzyme). Entre as etapas, os cortes foram lavados 2 vezes com solução tampão TRIS pH 7,6. A reação foi revelada com 3,3'-Diaminobenzidina (K3468, Dako Liquid DAB Plus; Dako), por 5 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer (LAFAN, #15772), lavados em imersões de água, desidratados em soluções crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%), diafanizados em 2 banhos de xilol (5 minutos cada) e montados na máquina. O controle positivo utilizado foi rim de camundongo e em todas as reações dos grupos experimentais. Apenas as amostras que expressaram os genes foram incluídas na análise estatística.

4.7 Indução da expressão do gene HOXA9

4.7.1 Transfecção

A linhagem celular SCC4 foi semeada em placas de cultivo de 28,2 cm 2 (Nunc) em meio de cultivo apropriado contendo 10 % de FBS e incubada até a confluência de 80-90 %. Esta linhagem foi selecionada por apresentar níveis reduzidos de expressão do gene HOXA9, viabilizando sua utilização para o ensaio de indução da expressão. A transfecção ocorreu com 1 µg/ml dos vetores plasmidiais pCMV6 e pCMV6-HOXA9 (Origene) utilizando-se o reagente Lipofectamina 2000 (Life Technologies) na concentração de 2,5 µg/ml, de acordo com as instruções do fabricante. A mistura DNA/lipofectamina (proporção 1:2,5) foi realizada em OptiMEM (Invitrogen) e após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente os complexos foram adicionados às placas de cultivo. Após 6 horas, o meio de transfecção foi substituído por meio de cultivo convencional acrescido de 10 % de FBS por aproximadamente 48 horas. Após esse período, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de cultivo celular de 60mm e incubadas em meio de cultura. Após 15 dias de tratamento, as células resistentes ao antibiótico Geneticina na concentração 300 µg/ml (G-418, Invitrogen) foram expandidas, congeladas e cultivadas para extração de RNA, já descritos anteriormente 4.3. Três clones celulares transfectados com o vetor pCMV6-HOXA9 e um clone celular transfectado com o vetor pCMV6 (controle) foram selecionados para os experimentos de proliferação, diferenciação celular e apoptose. A análise de expressão do gene HOXA9 está descrito no item 4.3.

4.7.2 Análise da proliferação celular

Imunocitoquímica para Ki-67

As reações de imunocitoquímica foram realizadas para avaliação da expressão da proteína humana Ki-67, estritamente associada a células em proliferação estando ausente em células quiescentes. O Ki-67 é uma proteína nuclear expressa durante a fase G2/M do ciclo celular, e é utilizada para determinar a porcentagem de proliferação dos cânceres sólidos⁸⁰. Para comparar o potencial proliferativo dos clones celulares que apresentaram aumento da expressão do gene HOXA9 foi realizada imunocitoquímica para Ki-67. Considerou-se positivo os núcleos corados em marrom, independente da intensidade. Para este experimento, 2x10⁴ células suspensas em 0,4 ml de meio de cultura DMEN/F12 (Invitrogen) com 10% de SFB foram plaqueadas em lâminas para cultura celular com oito poços (Lab Tek Nunc, Naperville, IL). Após 24 horas do plaqueamento as células foram "carenciadas" pela adição de meio de cultivo livre de SFB por 48 horas, após lavagem com PBS. Em seguida as células foram novamente incubadas em meio de cultura DMEN/F12 (Invitrogen) com 10% de SFB e, após 24 horas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 min. Após a inibição da peroxidase endógena e bloqueio em PBS+BSA1% por 1 hora a temperatura ambiente, as células foram incubadas com anticorpo anti Ki67 (Anti-Human Ki-67 antigen, clone MIB-1, Dako, Dinamarca) na proporção 1:400 por 16 horas e posteriormente, com anticorpo secundário conjugado a biotina e complexo estreptavidina-biotinaperoxidase (Envision Dual Link System HRP, Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 min a temperatura ambiente. As reações foram feitas em duplicata, reveladas com diaminobenzidina (DAB, Dako) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. O índice da expressão imunocitoquímica de Ki67, representado pela porcentagem de células positivas para este marcador, foi determinado por meio da contagem de 1000 células da linhagem SCC4 e clones celulares utilizando-se o sistema de imagem KONTROM 400 (Zeiss Axio Imager A1).

4.7.3 Ensaios de apoptose

Para análise da apoptose da linhagem celular SCC4 superexpressando o gene *HOXA9* em comparação com as células transfectadas com o vetor controle foram realizadas reações de TUNEL, que é um método utilizado para detectar a fragmentação do DNA através da marcação da extremidade terminal de ácidos nucleicos.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

Para este ensaio, as células foram plaqueadas na concentração de 2x10⁴ células por poço em lâminas de cultivo de 8 poços (Lab Tec) e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO2. Após 24h de cultivo celular, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 25 min a 4°C e depois lavadas duas vezes em PBS, com uma duração de 5 minutos cada. Para permeabilização das células, as lâminas foram imersas em PBS com Triton® X-100 0,2% por 5 minutos, e novamente realizada duas lavagens em PBS, com duração de 5 minutos cada. Em seguida, foi adicionado Equilibration Buffer em temperatura ambiente por 10 minutos e então, as células foram incubadas com fluorescente TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) por 60 minutos em câmara úmida a 37°C, evitando exposição a luz. Para bloqueio da reação, as lâminas foram imersas em 2X SCC por 15 minutos seguido de três lavagens em PBS de 5 minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas usando Vectashield com DAPI. A porcentagem de células positivas para este marcador, foi determinada por meio da contagem de células da linhagem SCC4 e clones celulares utilizando-se o sistema de imagem KONTROM 400 (Zeiss Axio Imager A1).

A migração celular desempenha um papel importante em alguns processos biológicos normais, como embriogênese, morfogênese⁸¹, cicatrização de feridas⁸² assim como, em processos patológicos, como a formação de metástase⁸³.

Para investigar a capacidade de migração dos clones SCC4-HOXA9 em relação ao controle foi utilizado o soro fetal bovino como fator quimiotático, para tanto as células foram plaqueadas sem SFB durante 24h. O meio DMEN/F12 com 10% de SFB foi utilizado como quimiotático, adicionado na câmara inferior do transwell. Para o ensaio de migração, primeiramente foi adicionado 500ul de meio DMEN/F12 (Invitrogen) suplementado com 10% de SFB em cada poço de uma placa de 24 poços e inserido os insertos (# 353097, Falcon) com 10⁵ células ressuspendidas em 200ul de meio sem SFB. O experimento foi realizado em triplicata, e as células da SCC4 foram utilizadas como controle. Após 24h mantidos em estufa de 5% de CO2 a 37°C, o meio de cultura foi descartado, e os insertos foram lavados em PBS, em seguida os insertos foram fixados em paraformoldeído 4% por 2 minutos a temperatura ambiente e lavados novamente em PBS, e incubados em metanol por 20 minutos a temperatura ambiente seguida de duas lavagens em PBS. A seguir, os insertos foram acomodados em placa de 24 poços contendo azul de toluidina por 15 minutos protegidos da luz. Após a lavagem com PBS, com auxílio de um cotonete, a face superior da membrana foi limpa, retirando todas as células que não migraram. Então, os insertos foram acomodados no SDS 1% e mantidos por 30 minutos a 37ºC. Para eluição do corante, após o período de incubação, foram transferidos 100 µL da solução para um poço de uma placa de 96 poços e realizada a leitura a 632 nm no espectofotômetro (ELX800, Bio-Tek Instruments, INC). A SCC4 incubada em meio sem SFB (inserto e no poço) foi utilizada como branco para análise.

Para análise protéica, 30 casos de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal pertencentes aos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica das Instituições envolvidas (Hospital das Clínicas da FMUSP, Hospital Heliópolis e Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho) foram utilizadas. Os blocos parafinados foram seccionados (3µm) em micrótomo e os cortes colocados sobre lâminas de vidro silanizadas. As lâminas ficaram armazenadas em uma estufa a 60°C, permanecendo por um tempo estimado de 2h. A seguir, foi realizada a desparafinização em três banhos de xilol, por 10 minutos cada. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (álcool absoluto I, álcool 90%, álcool 70%, álcool 50%) por duas vezes cada durante 3 minutos por passagem. Após essa etapa, seguiu-se lavagem em água destilada e quatro banhos de 2 minutos e 30 segundos em PBS. Seguiuse com o bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% diluída em PBS por 45 minutos. Para recuperação antigênica as lâminas foram emergidas em citrato-fosfato (P4809, pH 6,0; Sigma, St Louis, MO, USA) ph 6,0 e levadas ao banho maria 95°C por 20 minutos e por mais 20 minutos deixadas em temperatura ambiente. Logo após, foi realizado um tamponamento com 4 banhos de PBS por 2 minutos e 30 segundos cada e, em seguida, o bloqueio de sítios inespecíficos com Protein Block (Invitrogen) por 10 minutos seguida da incubação do anticorpo primário policional (HOXA9 #07-178, Millipore) diluído em, na proporção 1:100 a 4°C por 18 horas. Em seqüência, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina e complexo estreptavidina-biotinaperoxidase (Envision Dual Link System HRP) por 30 min a temperatura ambiente Entre as etapas, os cortes foram lavados 4 vezes com solução tampão PBS por 2 minutos e 30 segundos cada. A reação foi revelada com 3,3'-Diaminobenzidina (K3468, Dako Liquid DAB Plus; Dako), por 1 minuto a temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer (LAFAN, #15772), lavados em imersões de água, desidratados em soluções crescentes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em 2 banhos de xilol (5 minutos cada) e montados manualmente. O controle positivo utilizado foi rim de rato e foi incubado juntamente com os grupos experimentais. Para análise estatística, foi atribuído score para imunomarcação citoplasmática: 0 (negativo) = <10% das células marcadas; 1 (fraco) = 11% - 50% de células marcadas; 2 (moderado) = 51% - 80% de células marcadas; 3 (forte) = > 81% de células marcadas; e de intensidade: 1 (fraca); 2 (moderada); 3 (forte). Foi realizada a soma do score de marcação citoplasmática e de intensidade, sendo considerada score negativo quando o resultado da soma (0-1); positivo fraco (2-3); positivo forte (4-6).

4.9 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais das variáveis nominais ou categóricas, e para as variáveis numéricas, medidas estatísticas tais como valor mínimo, valor máximo, média, mediana e desvio padrão foram utilizadas.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de medidas quantitativas de amplificação e metilação em amostras de tumor e margem de maneira geral. Já para comparação das categorias de amplificação e metilação nos tumores de acordo com as variáveis clínicas e patológicas, foi realizada pelo teste Exato de Fisher. As variáveis clínicas testadas foram localização (língua ou assoalho), diferenciação histológica (bem ou moderadamente e pouco diferenciados), infiltração linfática, sanguínea e invasão perineural (presentes ou ausentes). A fim de viabilizar esses cruzamentos estatísticos, foi utilizado o valor acima da mediana de amplificação nos tumores como ponto de corte para categorizar as amostras positivas para amplificação; e percentuais de metilação igual ou superior a 50% para categorizar as amostras positivas para metilação.

Com o intuito de avaliar o relacionamento entre possíveis marcadores de amplificação e metilação com o evento morte, foi utilizado o método não paramétrico de Kaplan-Meier), que permite a construção de curvas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de duração entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último acompanhamento de observação, considerando-se apenas o desfecho óbito relacionado à neoplasia. Assim, a evolução durante todo o período de seguimento do indivíduo é considerado e não só os resultados finais. As curvas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de observação elaboradas utilizando-se o estimador produto-limite de Kaplan-Meier são construídas de forma que as estimativas calculadas independem da condição do paciente, isto é, não são consideradas as outras informações como sexo, idade, etc. Para avaliar a influência dessas variáveis, as curvas de Kaplan-Meier foram construídas para as categorias de cada variável qualitativa e para a comparação das curvas foi utilizado o teste de Log-Rank. Neste tipo de análise, para cada variável é realizado um teste de significância que indica se a variável em questão influencia ou não a resposta de interesse (óbito).

A análise quantitativa da expressão foi realizada de acordo com o método matemático de Pfaffl (2001) e a eficiência da reação de PCR foi obtida utilizandose 5 diluições seriadas do cDNA da linhagem celular KNO, quantificada em triplicata. A eficiência da reação para cada gene analisado foi determinada por meio da respectiva diluição do cDNA X valores de Ct e calculada por meio da equação E =10(-1/slope), na qual 'E' é a eficiência e 'slope' representa o coeficiente angular da reta.

A fim de verificar se existiu associação entre a expressão proteica de DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e HOXA9 e os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes foi aplicado o teste exato de Fisher, considerando para as DNMTs dois grupos: imunomarcação negativa ou baixa, incluindo os casos com escores 0, 1 e 2; e imunomarcação positiva e alta, incluindo casos com escore 3. E para HOXA9 foi atribuído score para imunomarcação citoplasmática: 0 (negativo) = <10% das células marcadas; 1 (fraco) = 11% - 50% de células marcadas; 2 (moderado) = 51% - 80% de células marcadas; 3 (forte) = > 81% de células marcadas; e de intensidade: 1 (fraca); 2 (moderada); 3 (forte). Foi realizada a soma do score de marcação citoplasmática e de intensidade, sendo considerada score negativo quando o resultado da soma (0-1); positivo fraco (2-3); positivo forte (4-6). Posteriormente, foram também estimadas as probabilidades de sobrevida dos pacientes de acordo com o nível de expressão proteica positiva e negativa, utilizando-se o tempo de duração entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último seguimento, considerando-se o desfecho óbito relacionado à neoplasia.

Para comparação dos efeitos do aumento de expressão do gene *HOXA9* sobre a proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular foi utilizado o teste de variância ANOVA seguida pelo T de Tukey.

O nível de significância adotado em todas análises foi de 5%, ou seja, quando o valor de p do teste estatístico foi menor ou igual a 0,05 existiu significância estatística. O software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de amplificação genômica dos genes homeobox

Os dados clínicos referentes aos casos analisados estão descritos no (Anexo B).

Nos 21 casos de tumor e 17 casos de margens adjacentes estudados, a amplificação do gene *HOXA5* foi revelada em 3 casos de tumor e 11 casos de margens adjacentes; o gene *HOXA7* em 8 casos de tumor e 1 caso de margens adjacentes; o gene *HOXA9* em 15 casos de tumor e 2 casos de margens adjacentes; o gene *HOXB5* em 3 casos de tumor e 9 casos de margens adjacentes; o gene *HOXB5* em 14 casos de tumor e 5 casos de margens adjacentes; e por fim, o gene *HOXC12* em 11 casos de tumor e 2 casos de margens adjacentes.

<u>HOXA5</u>

Na análise de amplificação do gene *HOXA5*, existiu uma diferença significativa entre tumor e margem adjacente (p=0,0024, Teste Mann Whitney), com os valores de mediana do tumor (Mediana=0,55; DP=9,12) menores em relação às margens (Mediana=1,14; DP=0,29) (Gráfico 5.1). Porém, não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,32) (Gráfico 5.2).



Gráfico 5.1 - Distribuição do número de cópias para o gene HOXA5 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margem adjacente. Teste Mann Whitney p=0,0024



Gráfico 5.2 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,32) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA5*

<u>HOXA7</u>

Na análise de amplificação do gene HOXA7, não houve diferença significativa entre tumor e margem adjacente (p=0,91, Teste Mann Whitney), com os valores de mediana do tumor (Mediana=0,82; DP=1,62) menores em

relação às margens adjacentes (Mediana=0,89; DP=0,41) (Gráfico 5.3). Também não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, com exceção da localização, em que o gene *HOXA7* apresentou-se mais amplificado em assoalho bucal do que em língua (Tabela 5.1). Quanto à influência na sobrevida global não se observou diferença estatistica significante (p=0,42) (Gráfico 5.4).



Gráfico 5.3 - Distribuição do número de cópias para o gene HOXA7 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,91



Gráfico 5.4 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,42) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA7*

Na análise de amplificação do gene *HOXA9*, não existiu uma diferença significativa entre tumor e margem adjacente (p=0,06, Teste Mann Whitney), com os valores de mediana no tumor (Mediana=1,41; DP=3,26) maiores em relação às margens adjacentes (Mediana=1,02; DP=0,4) (Gráfico 5.5). Também não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,37) (Gráfico 5.6).



Gráfico 5.5 - Distribuição dos valores do número de cópias para o gene *HOXA9* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,06



Gráfico 5.6 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,37) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA9*

Na análise de amplificação do gene *HOXB5*, existiu uma diferença significativa entre tumor e margem adjacente (p=0,04, Teste Mann Whitney), com os valores de mediana no tumor (Mediana=0,5; DP=1,48) menores em relação às margens (Mediana=1,41; DP=0,5) (Gráfico 5.7). Porém, não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,32) (Gráfico 5.8).



Gráfico 5.7 - Distribuição do número de cópias para o gene *HOXB5* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,04



Gráfico 5.8 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,32) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB5*

Na análise de amplificação do gene *HOXB13*, existiu uma diferença significativa entre tumor e margem adjacente (p=0,0005, Teste Mann Whitney), com os valores de mediana no tumor (Mediana=3,7; DP=32,75) maiores em relação às margens (Mediana=0,53; DP=0,79) (Gráfico 5.9). Porém, não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,64) (Gráfico 5.10).



Gráfico 5.9 - Distribuição dos valores do cópias para o gene *HOXB13* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,0005



Gráfico 5.10 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,64) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB13.*

Na análise de amplificação do gene *HOXC12*, não existiu uma diferença significativa entre tumor e margem adjacente (p=0,33, Teste Mann Whitney), com os valores de mediana no tumor (Mediana=1,10; DP=1,57) maiores em relação às margens (Mediana=0,81; DP=0,9) (Gráfico 5.11). Não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,57) (Gráfico 5.12).



Gráfico 5.11 - Distribuição do número de cópias para o gene *HOXC12* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens não-tumorais. Teste Mann Whitney p=0,33



Gráfico 5.12 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p=0,57) para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXC12*

De forma geral, a análise de amplificação foi importante para distinguir tumor e margem adjacente, principalmente em relação aos genes *HOXA5*, *HOXB5* e *HOXB13*, sendo que somente esse último apresentou-se amplificado no tumor, e os outros, na margem. Com relação ao desfecho clínico, a amplificação do gene *HOXA7* demonstrou predileção pela região de assoalho bucal em relação a língua. Porém, a amplificação de nenhum gene homeobox avaliado teve influência sobre o comportamento tumoral e sobrevida (Tabela 5.1).

	HOXA5		HOXA7		HOXA9		HOXB5			HOXB13			HOXC12					
Dados clínicos- patológicos	(+)	(-)	р	(+)	(-)	р	(+)	(-)	р	(+)	(-)	р	(+)	(-)	р	(+)	(-)	р
Localização			•			•			•			•			•			<u> </u>
Língua	12	2		11	3		6	9		12	2		3	10		7	6	
Assoalho	7	1	1	2	5	0,05	2	6	0,65	7	1	1	1	7	1	3	4	1
рТ																		
T1+T2	10	2		5	6	- · -	2	9		10	2		3	9		6	5	
T3+T4	6	1	1	6	1	0,15	3	4	0,32	7	0	0,50	2	4	1	3	3	0,97
рN																		
N+	9	1		7	3		3	7		10	0		3	7		4	5	
NO	6	2	0,55	2	5	0,15	1	6	0,60	6	2	0,18	2	6	1	4	3	1
Diferenciação Histológica																		
BD	3	1	0.42	3	1	1	1	3	1	3	1	0.22	1	3	1	2	2	1
MD+PD	12	1	0,43	8	5	1	4	9	'	13	0	0,23	3	10	'	7	5	I
Infiltração Linfática (IL) [†]																		
IL -	10	2	1	6	5	0.23	4	8	1	12	1	1	2	11	0.21	6	6	0.58
IL +	4	0		4	0	0,20	1	3	'	4	0		2	2	0,21	3	1	0,00
Infiltração Sanguínea (IS)†																		
IS -	12	2	4	9	5	0 51	5	9	4	13	1	4	3	11	4	7	6	4
IS +	3	0	1	3	0	0,51	1	2	1	3	0	I	1	2	'	2	1	I
IP -	6	1	4	3	4	0.40	2	5		6	1	0.42	2	5	4	4	3	4
IP +	8	1	1	8	1	0,10	4	5	1	9	0	0,43	2	7	'	4	4	I
Sobrevida																		
Vivo	14	3	4	10	6	4	6	10	0.00	14	3	4	2	14	0.00	6	8	4
Óbito	8	0	1	3	2	1	0	5	0,26	4	0	1	2	3	0,22	2	2	.1

Tabela 5.1 - Associação da amplificação dos seis genes homeobox com as características clínicas-patológicas e desfecho clínico em amostras de carcinoma epidermóide de boca

*(+) = positivo para amplificação; (-) = negativo para amplificação Teste Exato de Fisher e Log-Rank (sobrevida); ⁰ p ≤0,05; pT: Tamanho tumoral pelo pTNM; pN: comprometimento linfonodal pelo pTNM; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado. IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural

5.2 Perfil de expressão de mRNA dos genes homeobox

Os dados clínicos referentes aos casos analisados estão descritos no (Anexo C).

A análise da expressão do mRNA dos genes *HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13, HOXC12,* foi realizada em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margem adjacente por meio de PCR em tempo real. Para os genes *DNMT1, DNMT3a e DNMT3b,* foi realizada apenas em amostras tumorais. As amostras que não expressaram o gene analisado foram excluídas da análise. A expressão do gene *HOXA5* nessas amostras foi realizada e publicada pela Profa. Dra. Camila Rodini, por isso, não foram inseridas neste estudo.

<u>HOXA7</u>

No total de 24 amostras de tumor e 20 amostras de margem adjacente, 5 e 16 não expressaram o gene *HOXA7*, respectivamente. Portanto, apenas as amostras que expressaram o gene foram incluídas na análise estatística.

A análise da expressão do gene *HOXA7*, não mostrou diferença estatística entre tumor e margem (p=0,088), sendo que os valores de mediana no tumor (Mediana = 2,235) foram maiores em relação às margens (Mediana = 1,547) (Gráfico 5.13).



Gráfico 5.13 - Valores da expressão normalizada para o gene HOXA7 em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,088

No total de 24 amostras de tumor e 20 amostras de margem adjacente, 5 e 17 não expressaram o gene *HOXA9*, respectivamente. Portanto, apenas as amostras que expressaram o gene foram incluídas na análise estatística.

A análise de expressão do gene *HOXA9*, não mostrou diferença estatística entre tumor e margem (p=0,3591), sendo que os valores de mediana no tumor (mediana = 0,2153) foram maiores em relação às margens (mediana = 0,04987) (Gráfico 5.14).



Gráfico 5.14 - Valores da expressão normalizada para o gene *HOXA9* em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,3591

HOXB5

No total de 28 amostras de tumor e 22 amostras de margem adjacente, 8 e 19 não expressaram o gene *HOXB5*, respectivamente. Portanto, apenas as amostras que expressaram o gene foram incluídas na análise estatística.

A expressão de mRNA do gene *HOXB5* mostrou diferença estatística entre tumor e margem (p=0,0191), sendo que os valores de mediana no tumor (mediana = 1,666) foram maiores em relação às margens (mediana= 0,5525) (Gráfico 5.15).



Gráfico 5.15 - Valores da expressão normalizada para o gene HOXB5 em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,0191

<u>HOXC12</u>

No total de 29 amostras de tumor e 21 amostras de margem adjacente, 18 e 16 não expressaram o gene *HOXC12*, respectivamente. Portanto, apenas as amostras que expressaram o gene foram incluídas na análise estatística.

Não houve diferença estatística entre tumor e margem (p=0,2127) quando a expressão do gene *HOXC12* foi analisada, sendo que os valores de mediana do tumor (Mediana=3,499) exibiram valores maiores em relação às margens (Mediana=2,223) (Gráfico 5.16).



Gráfico 5.16 - Valores da expressão normalizada para o gene *HOXC12* em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,2127

No total, 14 amostras de tumor, apenas 3 amostras não expressaram o gene DNMT3b e 1 amostra o gene DNMT1. Portanto, apenas as amostras que expressaram os genes foram incluídas na análise estatística.

As DNMTs exibiram baixos valores de expressão de mRNA nos tumores, com exceção da DNMT3b (Gráfico 5.17), sendo que os valores da mediana no tumor para DNMT1 (Mediana=8,911) menor que a DNMT3a (Mediana=88,34) e DNMT3b (Mediana= 635,7).



Gráfico 5.17 -Distribuição dos valores da mediana da expressão normalizada para *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* em relação ao gene constitutivo HPRT em amostras de carcinoma epidermóide de boca

5.3 Perfil de metilação dos genes homeobox

Os dados clínicos referentes aos casos analisados estão descritos no Anexo B.

No presente estudo, a análise do perfil global de metilação nas amostras tumorais e margens adjacentes de carcinoma epidermóide de boca para os seis genes analisados (*HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12*) mostraram percentuais de metilação do DNA baixos, como demonstrado na figura 5.1. Nos 21 casos de tumor e nas 17 margens, os dados de metilação do

DNA para o gene *HOXA5* revelaram três casos de tumores e uma margem adjacente com valores percentuais de hipermetilação superiores a 50%; um tumor e nenhuma margem adjacente para os genes *HOXA7* e *HOXB13;* três tumores e nenhuma margem adjacente para o *HOXA9*; dois tumores e nenhuma margem adjacente para os genes *HOXA9*; dois tumores e nenhuma margem adjacente para os genes *HOXB5* e *HOXC12.*



Figura 5.1 – Diagrama do agrupamento hierárquico do perfil diferencial de metilação de seis genes homeobox em amostras de tumores e margens de carcinoma epidermóide de boca. Dados visualizados colorimetricamente em "heat plots", vermelho representando maiores níveis de metilação e verde menores níveis de metilação

HOXA5

A análise da metilação do DNA do gene *HOXA5*, não mostrou diferença significativa entre tumor e margem (p=0,0615, Teste Mann Whitney), com valores de mediana do tumor (mediana=16,45; DP=21,63) maiores em relação às margens (mediana=6,77; DP=13,95) (Gráfico 5.18). Também não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,2056) (Gráfico 5.19).



Gráfico 5.18 - Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene HOXA5 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,0615



Gráfico 5.19 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA5* (p=0,2056)

<u>HOXA7</u>

Na análise de metilação do *HOXA7*, não existiu uma diferença significativa entre tumor e margem adjacente (P=0,1297, Teste Mann Whitney), com valores de mediana no tumor (mediana=9,135; DP=16,39) maiores em relação às margens adjacentes (mediana=0,74; DP=8,41) (Gráfico 5.20). Não houve

diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,4767) (Gráfico 5.21).



Gráfico 5.20 - Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene HOXA7 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,1297



Gráfico 5.21- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene HOXA7 (p=0,4767)

HOXA9

Na análise de metilação do HOXA9, existiu uma diferença significativa (P=0,0100, Teste Mann Whitney) entre tumor e margem adjacente, com os

valores de mediana no tumor (mediana=15,78; DP=26,36) maiores em relação às margens adjacentes (mediana=1,38; DP=11,33) (Gráfico 5.22). Não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,76) (Gráfico 5.23).



Gráfico 5.22 - Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene HOXA9 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney p=0,0100



Gráfico 5.23 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXA9* (p=0,76)

<u>HOXB5</u>

Na análise de metilação do *HOXB5*, existiu uma diferença significativa (p=0,0490, Teste Mann Whitney) entre tumor e margem adjacente com os valores de mediana no tumor (mediana=5,64; DP=18,8) maiores em relação às margens adjacentes (mediana=0,86; DP=8,695) (Gráfico 5.24). Não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, porém, os casos que apresentaram *HOXB5* metilado tiveram menor sobrevida (p=0,03), demonstrando influência significativa na sobrevida global (Gráfico 5.25).



Gráfico 5.24 - Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene *HOXB5* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney (p=0,0490)



Gráfico 5.25 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB5 (*p=0,03)

<u>HOXB13</u>

Na análise de metilação do *HOXB13* houve diferença estatística entre as medianas (p=0,0167, Teste Mann Whitney), com as margens adjacentes exibindo valores mediana (mediana=0,96; DP=8,383) menores em relação aos tumores (mediana=6,62; DP=15,96) (Gráfico 5.26). Não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p= 0,6257) (Gráfico 5.27).

Metilação HOXB13



Gráfico 5.26 - Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene *HOXB13* em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney (p=0,0167)



Gráfico 5.27 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene *HOXB13* (p= 0,6257)

<u>HOXC12</u>

Na análise de metilação do *HOXC12*, existiu diferença estatística entre as medianas (p=0,0012, Teste Mann Whitney) de tumor e margem adjacentes, sendo as margens adjacentes exibindo valores da mediana menores (mediana=1,03; DP=12,34) em relação aos tumores (mediana=16,24;

DP=22,29) (Gráfico 5.28). Não houve diferença estatística na relação com as variáveis clínicas e histopatológicas, nem influência na sobrevida global (p=0,4767) (Gráfico 5.29).



Gráfico 5.28 - Distribuição dos valores da porcentagem da metilação para o gene HOXC12 em amostras de carcinoma epidermóide de boca e margens adjacentes. Teste Mann Whitney (p=0,0012)



Gráfico 5.29 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para indivíduos com amplificação positiva e negativa para o gene HOXC12 (p=0,4767)

Na análise de metilação do DNA dos 6 genes homeobox, 4 foram relevantes para distinguir entre tumor e margem, incluindo HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12, sendo que todos apresentaram valores maiores de metilação no tumor em relação a margem. Porém, os genes homeobox

analisados não foram relevantes na determinação de comportamento tumoral, com exceção do gene *HOXB5* que se apresentou metilado nos pacientes com menor sobrevida como demonstrado na tabela 5.2.
		HOXA5			HOXA7			HOXA9			HOXB5			HOXB13			HOXC12	
Dados clínicos- patológicos	(+)	(-)	Valor p	(+)	(-)	Valor p	(+)	(-)	Valor p	(+)	(-)	Valor p	(+)	(-)	Valor p	(+)	(-)	Valor p
Localização			F			F	(-)		F			r			F			F
Língua	11	2		12	12 1 11	11	2		12	1		12	1		12	1		
Assoalho	7	1	1	7	1	1	7	1	1	7	1	1	8	0	1	7 1	1	
рТ																		
T1+T2	10	3		11	2		10	10 3	11	2		12	1		11 2 7 0	2		
T3+T4	7	0	0,5211	7	0	0,5211	7 0 0,52	0,52	7	0	0,5211	7	0	1		0	0,5211	
рN																		
N+	8	1	0 5705	9	0		9	0	0,08	9	0	0,2059	9	0	0,4706	9	0	0,2059
N0	6	2	0,5765	6	2	0,2059	5	3		6	2		7	1		6	2	
Diferenciação Histológica																		
BD	4	0	0 5165	4	0	1 3 10	1	0.47	4	0	1	4	0	1	4	0	1	
MD+PD	8	3	0,5165	10	1		10	1	0,47	10	1	'	10	1	1	10	1	I
Infiltração Linfática (IL) [†]																		
IL -	11	2	0 4026	6 12 1 0,5 4 0	1	0 5675	11	2	0.4	12	1	0 5675	12	1	0 5675	12	1	0 5675
IL +	4	0	0,4030		0,0075	4	0	0,4	4	0	0,3075	4	0	0.3075	4	0	0,3675	
Infiltração Sanguínea (IS)†																		
IS -	12	2	0 40 47	13	1	4	12	2	4	13	1		13	1	4	13	1	4
IS +	2	1	0,4647	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1
IP -	6	1		7	0 .	6	1		7	0		7	0		7	0		
IP +	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1
Sobrevida [†]																		
Vivo	12	1	0.2056		13	0 4767	13	0	0.76	13	0	0.02	13	0	0.6057	13	0	0 4767
Óbito	3	2	0,2056	3	2	0,4707	2	3	0,76	3	2	0,03	2	3	0,0257	2	3	0,4707

Tabela 5.2 – Associação da metilação dos seis genes homeobox com as características clínicas-patológicas e desfecho clínico em amostras de carcinoma epidermóide de boca

**(+) = positivo para metilaç; (-) = negativo para metilação; Teste Exato de Fisher e Log-Rank (sobrevida); ⁰ P ≤0,05; pT: Tamanho tumoral pelo pTNM; pN: comprometimento linfonodal pelo pTNM;
 BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado. IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural.

Nas linhagens celulares, os genes *HOXB5 e HOXC12* apresentaram-se metilados em 2 linhagens celulares (SCC4 e SCC9), o *HOXB13* revelou-se metilado na SCC9 e o *HOXA9* na SCC4, como demonstrado na figura 5.2.



Figura 5.2 – Diagrama do agrupamento hierárquico do perfil diferencial de metilação de 6 genes homeobox em quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca. Dados visualizados colorimetricamente em "heat plots", vermelho representando maiores níveis de metilação e verde menores níveis de metilação

Frente a esses achados, os genes escolhidos para o ensaio de desmetilação e posterior análise de expressão foram os que apresentaram perfil de metilação 100%, sendo eles: *HOXC12, HOXA9, HOXB5* na linhagem celular SCC4 e, *HOXB13* na linhagem celular SCC9. Para tanto, foi necessário realizar um estudo de padronização do agente desmetilante 5-aza-2´-deoxicitidina (5-aza), uma vez que vários estudos tem utilizado concentrações diferentes desse agente em linhagem celular derivadas de câncer de boca. As concentrações variam na literatura de 0,5uM⁸⁴ a 10uM⁸⁵, e ainda concentrações intermediárias de 2,5uM⁸⁶ e 5uM⁸⁷ também são utilizadas. Por isso, para realizar esse experimento, foi necessário antes, realizar o ensaio de viabilidade celular com MTT para escolha da concentrações foram prejudiciais às células, invalidando o experimento, e a concentrações foram prejudiciais às células, invalidando o desmetilação, mantendo aproximadamente 60% de células viáveis, no período de 96h, como demostrado na figura 5.3.



Figura 5.3 – Representação gráfica da porcentagem de células viáveis proveniente da linhagem celular SCC4 após tratamento com três concentrações diferentes do agente desmetilante 5-aza-2´-deoxicitidina em quatro diferentes períodos de tempo

5.3.1 Ensaio de desmetilação

A ação do 5-aza é caracterizada pela sua incorporação ao DNA causando inibição eficiente das DNMTs. Para explorar o papel da desmetilação na expressão gênica, as linhagens celulares foram tratadas com 5-aza e avaliado o efeito inibitório na expressão gênica das DNMTs.

Para análise da expressão, utilizou-se como amostra calibradora a célula não tratada. Como resultado, foi evidente o aumento da expressão gênica dos genes *HOXA9, HOXB5 e HOXC12* na linhagem SCC4, e *HOXB13* na linhagem SCC9 após o tratamento com 5-aza, sendo que a expressão gênica do *HOXA9 e HOXB5* aumentaram quase 8 vezes e dos genes HOXC12 e *HOXB13* em 7 vezes (Gráfico 5.30).



Gráfico 5.30 - Expressão relativa (log2) após o tratamento com decitabina dos genes HOXA9, HOXB5 e HOXC12 na linhagem SCC4, e HOXB13 na linhagem SCC9. As células sem tratamento foram utilizadas como controle.

5.3.2 Imunohistoquímica DNMT1, DNMT3a e DNMT3b

A imunoexpressão proteica das DNMTs foi analisada semiquantitativamente, baseada nos critérios de Rahman e colaboradores⁸⁸, que consistem em expressão baixa (escore 0: negativo; escore +1: <20% de células imunocoradas), moderada (escore +2: \geq 20% e < 50%) e alta (escore +3: \geq 50%). Apenas marcação nuclear foi considerada específica e na análise estatística de Fisher considerou-se positiva a imunomarcação com score 3. Os dados clínicohistopatológico e a correlação da expressão com o desfecho clínico estão descritos na tabela 5.3. A análise qualitativa foi estabelecida quanto ao padrão de marcação (homogêneo ou heterogêneo) nas diferentes áreas da neoplasia (Figura 5.4).

<u>DNMT1</u>

Nos tumores, 10 casos foram considerados positivos (imunomarcação score 3) e 7 casos negativos (imunomarcação score 0, 1 e 2). Foi possível observar imunomarcação predominantemente citoplasmática nas células mais centrais das ilhotas tumorais. A DNMT1 não apresentou influência estatisticamente significante na comparação com dados clínicos, histopatológicos e de sobrevida.

<u>DNMT3a</u>

Nos carcinomas analisados, 8 casos foram considerados positivos (imunomarcação score 3) e 9 casos negativos (imunomarcação score 0, 1 e 2) para o anticorpo DNMT3a, sendo a marcação nuclear e citoplasmática homogênea nas ilhotas e lençóis de células tumorais, inclusive em células exibindo evidente pleomorfismo e células isoladas. A DNMT3a não apresentou influência estatisticamente significante sobre os parâmetros clínicos nem histológico, porém houve correlação com a sobrevida (p=0,02).

DNMT3b

Nos tumores, 15 casos foram considerados positivos (imunomarcação score 3) e 5 casos negativos (imunomarcação score 0, 1 e 2). Foi possível observar imunomarcação predominantemente nuclear nas células das ilhotas e cordões tumorais. A DNMT3b não apresentou estatística significante na comparação com dados clínicos, histopatológicos e de sobrevida.

Dados clínico-	Nº Casos				Nº Casos				Nº Casos			
patologicos	Casus			Valor	Casus		DINIVITSa	Valor	Casus		DIVIVITSD	Valor
		Negativo	Positivo	p		Negativo	Positivo	р		Negativo	Positivo	р
Localização												
Língua	10	6	4	0,06	10	5	5	0,66	11	3	8	1
Assoalho	9	1	8		8	5	3		8	2	6	
рТ												
T1+T2	11	4	7	0,63	13	9	4	0,11	14	4	10	1
T3+T4	6	3	3		5	1	4		6	1	5	
рN												
N+	10	4	6	1	11	7	4	0,63	12	3	9	1
N0	7	3	4		7	3	4		8	2	6	
Diferenciação Histológica												
BD	6	2	4	1	7	3	4	0,63	7	2	5	1
MD+PD Infiltração Linfática (IL) [†]	11	5	6		11	7	4		13	3	10	
IL -	7	4	3	1	8	4	5	1	9	3	6	1
IL +	4	2	2		3	3	2		4	2	2	
Infiltração Sanguínea (IS)†					-							
IS -	11	5	6	1	13	7	6	0,48	14	4	10	0,17
IS +	3	1	2		2	2	0		3	2	1	
IP -	7	3	4	1	8	6	2	1	9	3	6	1
IP +	7	3	4		7	3	4		8	2	6	
Sobrevida [†]												
Vivo	8	4	4	0,37	9	4	5	<mark>0,02</mark>	10	3	7	0,61
Óbito	4	1	3		4	4	0		5	2	3	

Tabela 5.3 – Associação da expressão proteica das DNMT1, DNMT3a e DNMT3b com as características clínico-patológicas e desfecho clínico em carcinoma epidermóide de boca

*Teste Exato de Fisher e Log-Rank (sobrevida); ^e P ≤0,05; † Informações perdidas; pT: Tamanho tumoral pelo pTNM; pN: comprometimento linfonodal pelo pTNM; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado. IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural; Evento 0: vivo; Evento 1: morte pela neoplasia



Figura 5.4 – Imagens representativas das marcações imuno-histoquímicas para os anticorpos DNMT1 (A), DNMT3a (B) e DNMT3b (C). Em A, observamos carcinoma epidermóide bem diferenciado mostrando marcação predominantemente citoplasmática nas células mais centrais das ilhotas tumorais. Marcação citoplasmática e nuclear pode ser observada em B, nas ilhotas tumorais de carcinoma epidermóide bem diferenciado. Em C, observamos área de carcinoma pouco diferenciado mostrando marcação predominantemente nuclear nas células das ilhotas e cordões tumorais. Aumento de 100x em A, B e C

5.4 Indução da expressão do gene HOXA9

Os dados clínicos referentes aos casos analisados estão descritos no (Anexo D).

A linhagem SCC4 foi transfectada com os vetores pCMV6 (controle) e pCMV6-*HOXA9*. Após a seleção dos clones por meio do antibiótico geneticina G418, a expressão gênica de *HOXA9* foi avaliada por qRT-PCR. Observou-se a

superexpressão do gene HOXA9 nos clones celulares transfectados com o vetor pCMV6-HOXA9 em relação aos clones controles e à linhagem SCC4 (Gráfico 5.31).

Três clones celulares que apresentaram maior expressão do mRNA do gene *HOXA9* (SCC4-*HOXA9*) e um clone celular SCC4-pCMV6 foram selecionados para a realização dos ensaios de proliferação celular, diferenciação, apoptose e migração.



Gráfico 5.31 - Expressão do gene HOXA9, normalizada com o gene constitutivo GAPDH, na linhagem SCC4 transfectada com o vetor pCMV6 (controle) e dos três clones celulares transfectadas com o vetor pCMV6-HOXA9

5.4.1 Efeito da indução da expressão do gene *HOXA9* sobre a proliferação celular

Houve redução no índice de proliferação dos clones celulares com aumento da expressão do gene *HOXA9* quando comparados com o controle, embora não significante (p=0,08) como demonstrado no gráfico 5.32.



Gráfico 5.32 - Representação gráfica das células positivas para Ki-67. Não houve diferença estatística significante entre os clones SCC4-HOXA9 e controle SCC4-pCMV6 p=0,08

5.4.2 Efeito da indução da expressão do gene *HOXA9* sobre a migração celular

Observou-se uma diminuição da capacidade de migração dos três clones pCMV6-*HOXA9* em relação ao pCMV6 (controle) como mostrado no gráfico 5.33.



Gráfico 5.33 – Inibição da migração dos três clones de células transfectadas com o vetor SCC4-HOXA9 em relação àquela com o vetor pCMV6 (controle) após 24h de incubação com o meio DEMEN/F12 como fator quimiotático

5.4.3 Efeito da indução da expressão do gene *HOXA9* sobre a apoptose celular

A taxa de morte celular foi avaliada através da técnica de TUNEL. Não houve diferença estatística significante na taxa de morte celular entre a linhagem celular SCC4 e aquelas com indução da expressão do gene *HOXA9*. Desta maneira, foi observado que o aumento da expressão do gene *HOXA9* na linhagem celular SCC4 não promoveu alteração na taxa de apoptose.

5.5. Análise imunohistoquimica do *HOXA9* em carcinoma epidermóide de boca

Para análise da expressão proteica, foi realizada imunohistoquimíca do *HOXA9* em amostras parafinadas de carcinoma epidermóide de boca (Figura 5.5). Nas margens, observou-se uma imunomarcação predominantemente nuclear nas células basais e parabasais do epitélio de revestimento. Nas amostras tumorais, a imunomarcação foi nuclear e citoplasmática, sendo a marcação citoplasmática presente na maioria das células neoplásicas nos cordões e ilhotas tumorais. Como descrito na tabela 5.4, não foi possível correlacionar estatisticamente com parâmetros clínicos.



Figura 5.5 - Imagens representativas das marcações imuno-histoquímicas para o anticorpo HOXA9. Em A, observamos epitélio não tumoral mostrando marcação predominante nas células basais e parabasais do epitélio de revestimento. Em B, observamos área de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado mostrando marcação citoplasmática na maioria das células neoplásicas. Aumento inicial de 100x em A e B

Dados clínico-natológicos	N° de	Imunomarca	P valor*			
Dauos cimico-patologicos	casos	Negativo	Positivo	r valoi		
Localização						
Língua	3	1	2	1		
Assoalho	13	5	8	I		
Língua+Assoalho	9	4	5			
рТ						
T1+T2	16	5	11	0.11		
T3+T4	9	6	3	0,11		
pN						
N+	13	6	7	0.67		
NO	9	3	6	0,07		
Infiltração Linfática (IL) [†]						
IL -	15	6	9	0.69		
IL +	12	3	9	0,00		
Infiltração Sanguínea (IS) [†]						
IS -	18	8	10	1		
IS +	6	3	3			
IP -	8	4	4	1		
IP +	14	6	8	I		
Infiltrado Inflamatório peritumoral						
Escassa	9	3	6	0.64		
Moderada	10	5	5	0,04		
Sobrevida [†]						
Vivo	16	6	10	0.24		
Óbito	9	5	4	0,24		

Tabela 5.4 – Correlação da expressão proteica do *HOXA9* com as características clínicopatológicas e desfecho clínico em carcinoma epidermóide de boca

*Teste Exato de Fisher e Log-Rank (sobrevida); ^θ P ≤0,05; † Informações perdidas; pT: Tamanho tumoral pelo pTNM; pN: comprometimento linfonodal pelo pTNM. IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural; Evento 0: vivo; Evento 1: morte pela neoplasia.

6 DISCUSSÃO

A estimativa para o ano de 2015, segundo Globocan⁸⁹, é de 324.398 novos casos de câncer de boca e de lábio, ou seja, 24.025 mais casos em relação ao ano de 2012, sendo 215.283 casos acometendo homens e 109.115 em mulheres. A mortalidade prevista é de 157.139 casos no mundo. No Brasil, a estimativa é de 335.751 novos casos, sendo 222.814 em homens e 112.937 em mulheres. A incidência varia de acordo com a região, principalmente devido aos hábitos de vida associados ao câncer de boca, incluindo fumo, álcool, uso de betel⁹⁰, e também sabe-se que os fatores genéticos predisponentes exibem papel fundamental para o desenvolvimento da doença⁹¹. Os indicadores de prognóstico utilizados, tais como o estadiamento clínico e a graduação histológica do tumor, ainda não conseguem contribuir na predição do comportamento tumoral⁹². Como citado acima, estima-se que a taxa de mortalidade seja de 50% dos casos em 5 anos, o que não apresentou mudanças significativas nos últimos 50 anos apesar do desenvolvimento técnicocientífico⁹³. Sendo assim, torna-se necessário o conhecimento das características moleculares dessa neoplasia para que sejam identificados marcadores que auxiliem no diagnóstico precoce, definição do prognóstico e tratamento desta doença.

Uma vez que os genes homeobox participam da regulação de vários mecanismos biológicos importantes para a célula como: controle do crescimento e proliferação celular por meio da interação com proteínas que regulam o ciclo celular e as vias de apoptose, estabelecimento da identidade celular, indução de fatores de crescimento, citocinas e via de sinalização intracelular que facilitam a comunicação célula-célula^{6,24}, é justificável que a expressão aberrante de vários dos 39 genes *HOX* tem sido encontrada em vários tipos de câncer afetando várias das características tumorais, incluindo aumento de proliferação, angiogênese, invasão e resistência a apoptose⁹⁴. Embora inicialmente fosse considerado que apenas a regulação positiva dos genes homeobox promovesse também está associada com este processo⁹⁵. Um mecanismo comum que integra o controle da expressão de genes homeobox é o controle epigenético.

As ilhas CpG na região promotora de genes HOX silenciados encontram-se frequentemente metiladas.

No presente estudo, o gene HOXB5 se destacou por apresentar expressão elevada no tumor em relação a margem, baixa amplificação gênica, e a metilação do DNA presente nos tumores, sendo essa última correlacionada com a menor sobrevida de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca. A correlação dos três eventos não é tão simples, principalmente em relação a expressão e metilação. Como já demonstrado por Wagner e colaboradores⁹⁶ na análise desses dois eventos associando os genes HOX e fibroblastos, provou-se que existe uma variação inter-individual, com ilhas CpGs com padrões distintos podendo ter um relação positiva ou negativa na expressão gênica, respeitando outros eventos epigenéticos que ocorrem de maneira simultânea como a modificação em histona e acessibilidade a cromatina. Além disso, estudos recentes mostraram presença de SNPs próximas a sítios CpGs, cujo genótipo associa a metilação⁹⁷. A metilação pode ser altamente variável em todos os tipos celulares com sítios variáveis divididos em duas grandes categorias: aqueles com correlação inversa entre metilação do DNA e acessibilidade da cromatina, e aqueles com acessibilidade cromatina variável e hipometilação do DNA⁹⁶.

O aumento da expressão do *HOXB5* em carcinoma epidermóide de boca também foi demonstrado por Tucci e colaboradores¹⁰, sendo associado com o fenótipo maligno da neoplasia, uma vez que houve perda do *HOXB5* no tecido não neoplásico e ganho no tumor. Além disso, pode ser relacionado com envolvimento nodal e pior prognóstico. Recentemente, expressão alterada dos genes homeobox tem sido associado com diferentes tumores sólidos, incluindo mama, pulmão, fígado e próstata^{23,98,99}. A expressão aberrante dos genes homeobox incluem três categorias principais: primeiro, esses genes podem estar re-expresso nas células e em condições normais, eles são expressos somente durante o desenvolvimento; Segundo, os genes homeobox podem estar expressos durante o desenvolvimento e terceiro, os genes homeobox podem estar pouco expressos nas células malignas derivados dos tecidos em que esses genes são normalmente expressos, nas células diferenciadas adultas⁶.

Contudo, os mecanismos envolvidos no processo de hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais ainda precisam ser melhor compreendidos. Existem estudos direcionados para a participação das DNA metiltransferases (DNMT) e sua complexa interação com as proteínas *Polycomb*, que são fatores cromatina-associados. A metilação aberrante tipicamente encontrada no câncer pode estar relacionada a alterações nestas interações, que comprometem a regulação precisa do epigenoma de células normais¹⁵.

Embora a metilação do DNA é vista como um mecanismo epigenético permanente, estudos tem observado que a perda da metilação pode ocorrer em contextos específicos de forma passiva e ativa, sendo o mecanismo ativo um processo enzimático que remove o grupo metil 5-metilcitosina (5meC) quebrando a ligação carbono-carbono. Por outro lado, a desmetilação passiva do DNA refere a perda do grupo 5meC quando DNMT1 é inibida ou ausente durante a replicação do DNA⁴⁸. A desmetilação do DNA é um mecanismo epigenético importante para silenciamento de genes transcritos pela RNA polymerase II ¹⁰⁰ e tem sido relacionada com a estabilidade e manutenção do estado da cromatina condensada ou descondensada e eventualmente determinar a expressão gênica⁴⁸. Quando a inibição é dada pela ação do 5-aza, a desmetilação ocorre incorporando dentro do DNA, degradando a DNMT, diminuindo a expressão do mRNA da DNMT e níveis de proteína ou reprimindo a atividade enzimática da DMNT, levando a mudança da reativação gênica¹⁰¹.

Sabendo-se que a expressão de genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B parece exercer importante função no desenvolvimento do câncer ao afetar o estado de metilação da região promotora de genes, a expressão dos mesmos em nível protéico e de transcritos se fez necessária a fim de correlacionar com os mecanismos regulatórios epigenéticos, sobretudo de genes homeobox hipermetilados. Corroborando com os nossos achados de expressão proteica de DNMT3B em amostras teciduais de tumor, Daniel et al. ¹⁰² não observaram diferença significativa nos níveis de DNMT3B ao estudar tecido controle (hiperplasia epitelial), leucoplasias (com e sem displasia epitelial) e carcinoma epidermóide de boca (de diferentes graus histológicos), não sendo possível diferenciar essas lesões e nem determinar um valor diagnóstico para este marcador durante as etapas da carcinogênese. Porém, foi possível observar

o uso de álcool, e a DNMT1 com pacientes fumantes. No presente estudo, não correlacionamos com os hábitos nocivos, porém observamos que o aumento da expressão proteica da DNMT3a estava presente em pacientes com menor sobrevida. O aumento da expressão não só da DNMT3a, mas também da DNMT3b e DNMT1 correlacionada com o pobre diferenciação histológica e pior prognóstico^{103,104}, tem sido encontrada também em outros tumores como próstata, coloretal, hepatocelular, mama, estômago e pulmão^{104–108}.

Apesar das enzimas DNMT3a e DNMT3b serem responsáveis por novas metilações, existe uma diferença entre elas comprovadas por Baubec et al. (2015)¹⁰⁹. A enzima DNMT3b possui afinidade por genes com altas taxas de transcritos, enquanto a DNMT3a possui um comportamento inverso, diminuindo a metilação desses genes. Portanto, o resultado do presente estudo na análise de expressão desses genes foi diferente, sendo a DNMT3b com valores mais altos de expressão nos tumores frescos.

Já foi considerado que a análise de metilação pode permitir a identificação de alterações epigenéticas como ferramenta diagnóstica sensível para detecção precoce do câncer¹¹⁰. Esses estudos comparam o perfil de metilação nos tumores em relação às margens não-tumorais, como também tentam associar os achados com dados clinico-patológicos. Apesar dos trabalhos ressaltarem a necessidade de analisar conjuntamente tecido sadio ou margem não tumoral adjacente, existem divergências na literatura. Enquanto alguns trabalhos apontam que o tecido sem comprometimento tumoral parece exibir baixas taxas de metilação, principalmente em se tratando de pacientes fumantes¹¹¹, outros estudos revelam que em tecido histologicamente sadio adjacente à neoplasia^{112,113} e em lesões cancerizáveis¹¹⁴ também pode exibir altos níveis de metilação, sugerindo que este se trata de um evento precoce. Nos casos estudados no presente trabalho, de uma maneira geral, todos genes apresentaram níveis de metilação baixo, talvez pelos pacientes incluídos serem fumantes o que poderia interferir no status de metilação. Porém, mesmo assim, quatro genes se destacaram, sendo eles: HOXA9, HOXB5, HOXB13 e HOXC12, por apresentarem níveis de metilação estatisticamente elevado no tumor em relação a margem, sendo que o HOXB5 pode ser correlacionado com menor sobrevida. Corroborando, esses mesmos genes encontraram-se com 100% de metilação em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca,

sendo o HOXA9, HOXB5 e HOXC12 na SCC4, e HOXB13 na SCC9, o que foi confirmado pelo ensaio de desmetilação pelo aumento de expressão após o tratamento com agente 5-aza.

Segundo o nosso conhecimento, não existe relatos inter-relacionando metilação e amplificação gênica em câncer de boca. Encontramos apenas um estudo realizado em amostras de câncer de mama, em que os genes com alta metilação apresentaram um aumento de aberrações de número de cópias comparados ao genes com baixa metilação, sugerindo que os achados podem ser relevantes para o desenvolvimento de terapias personalizadas que beneficiaria esses pacientes¹¹⁵. Não foi possível realizar essa correlação no presente estudo, pois apenas o gene *HOXB13* apresentou-se metilado e amplificado nos tumores, os demais genes, como *HOXB5*, apesar de estar metilado, possuiu uma baixa amplificação no tumor em relação a margem. O gene *HOXA5* apresentou-se com baixa amplificação, porém não estava metilado e o gene *HOXA7*, apesar da diferença estatística não ser significante entre tumor e margem, observou-se uma predileção pela região de assoalho bucal em relação a língua.

Dentre os genes homeobox, a metilação do gene HOXA9 tem sido bastante estudada em diferentes neoplasias, como de ovário⁶⁶, mama¹¹⁶, glioma⁷⁶ e de boca⁷⁸. Estudos funcionais tem revelado que a perda do HOXA9 promove crescimento nas células epiteliais mamárias e sobrevivência, bem como alteração na morfogênese tecidual. No entanto, restaurando a expressão do gene HOXA9 o efeito é inverso, reprimindo o crescimento e sobrevivência celular, e observou-se a inibição do fenótipo maligno das células de câncer de mama em cultura e em modelos de xenotransplante de rato¹¹⁶. Entretanto, no câncer de boca, a hipermetilação do HOXA9 pode levar a diminuição do reparo do DNA, aumentando o risco de desenvolvimento da neoplasia, particularmente em pacientes que fumam⁷⁸. Além disso, aumentar o risco de metástase cervical¹¹⁷. Como demostrado no presente estudo, e corroborando com os estudos da literatura, a indução da expressão do HOXA9 em linhagem derivadas de carcinoma epidermóide de boca, levaram a diminuição da migração celular e apesar de não ser estatisticamente significante, foi possível observar uma tendência na diminuição da proliferação celular, o que poderia contribuir para diminuição da metástase regional. Contudo, o ensaio funcional possibilitou

verificar que a diminuição de expressão do *HOXA9* pode estar associada com o comportamento migratório do carcinoma epidermóide de boca.

7 CONCLUSÕES

a. A investigação do aumento do número de cópias foi importante para distinguir tumor e margem, em relação aos genes *HOXA5*, *HOXB5* e *HOXB13*. E o gene *HOXA7* demonstrou predileção pela região de assoalho bucal em relação a língua;

 b. O gene HOXB5 apresentou expressão nos tumores em relação a margem adjacente;

c. De maneira geral, os genes homeobox apresentaram um perfil baixo de metilação, porém foi possível observar que os genes *HOXA9*, *HOXB5*, *HOXB13* e *HOXC12* apresentaram valores maiores de metilação no tumor em relação a margem, sendo que o *HOXB5* se destacou por se apresentar metilado nos pacientes com menor sobrevida;

d. Foi evidente o aumento da expressão dos genes HOXA9, HOXB5 e HOXC12 na linhagem SCC4, e HOXB13 na linhagem SCC9 após o tratamento com 5-aza;

e. O aumento da imunomarcação da DNMT3a foi correlacionada com pacientes de melhor prognóstico;

f. A indução da expressão do gene *HOXA9* promoveu diminuição da migração celular.

REFERÊNCIAS¹

- Smith IM, Glazer CA, Mithani SK, Ochs MF, Sun W, Bhan S, et al. Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testes antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. PLoS One [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Jun 24];4(3):e4961. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2654921&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Koscielny S, V Eggeling F, Dahse R. [Investigations to the influence of tumor supressor gene p16 inactivation on the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma]. Laryngorhinootologie [Internet]. 2004 Jun [cited 2015 Jun 24];83(6):374–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197677
- Beder LB, Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Gunduz E, Ito S, et al. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. Lab Invest [Internet]. 2003 Jan [cited 2015 Jun 24];83(1):99–105. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533690
- Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RCK, et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. Oncogene [Internet]. 2005 Jun 16 [cited 2015 Jun 24];24(26):4232–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824737
- Reis EM, Ojopi EPB, Alberto FL, Rahal P, Tsukumo F, Mancini UM, et al. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck, and thyroid cancer. Cancer Res [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2015 Jun 24];65(5):1693–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753364
- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? Nat Rev Cancer [Internet]. 2002 Oct [cited 2014 Nov 11];2(10):777–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360280
- 7. Nunes FD, de Almeida FC, Tucci R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. Pesqui Odontol Bras

¹ De acordo com estilo Vancouver

[Internet]. Jan [cited 2015 Jun 24];17(1):94–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908068

- Rodrigues MFSD, de Oliveira Rodini C, de Aquino Xavier FC, Paiva KB, Severino P, Moyses RA, et al. PROX1 gene is differentially expressed in oral cancer and reduces cellular proliferation. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2014 Dec [cited 2015 Mar 19];93(28):e192. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526434
- Rodini CO, Xavier FCA, Paiva KBS, De Souza Setúbal Destro MF, Moyses RA, Michaluarte P, et al. Homeobox gene expression profile indicates HOXA5 as a candidate prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol [Internet]. 2012 Apr [cited 2015 Jul 2];40(4):1180– 8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584618&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Tucci R, Campos MS, Matizonkas-Antonio LF, Durazzo M, Pinto Junior D dos S, Nunes FD. HOXB5 expression in oral squamous cell carcinoma. J Appl Oral Sci [Internet]. 2011 Apr [cited 2015 Jul 9];19(2):125–9. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4243750&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelialmesenchymal transition. Cancer Res [Internet]. 2006 Jan 15 [cited 2015 Jun 24];66(2):889–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424022
- Xavier FCA, Destro MF de SS, Duarte CME, Nunes FD. Epigenetic repression of HOXB cluster in oral cancer cell lines. Arch Oral Biol [Internet]. 2014 Aug [cited 2014 Nov 20];59(8):783–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859765
- Uchida K, Oga A, Okafuji M, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, et al. Molecular cytogenetic analysis of oral squamous cell carcinomas by comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet [Internet]. 2006 Jun [cited 2015 Jun 30];167(2):109–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16737909
- Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, et al. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. Genes Chromosomes Cancer [Internet]. 2009 Sep [cited 2015 Oct 7];48(9):828–41. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2738630&tool= pmcentrez&rendertype=abstract

- Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. Mutat Res [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2015 Jul 2];647(1-2):30–8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2647981&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 16. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature [Internet]. 1978 Dec 7 [cited 2015 Jun 26];276(5688):565–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/103000
- 17. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. Annu Rev Genet [Internet]. 1986 Jan [cited 2015 Jul 8];20:147–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2880555
- Chen H, Sukumar S. HOX genes: emerging stars in cancer. Cancer Biol Ther [Internet]. Jan [cited 2015 Jul 8];2(5):524–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614319
- Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. Oncogene [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2015 Jul 8];26(47):6766–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934484
- 20. Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: vertebrate homeobox genes. Mech Dev [Internet]. 1996 Mar [cited 2015 Jul 8];55(1):91–108. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734502
- Sharma S, Kelly TK, Jones P a. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 May 23];31(1):27–36. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2802667&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- López R, Garrido E, Vázquez G, Piña P, Pérez C, Alvarado I, et al. A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. Int J Gynecol Cancer [Internet]. Jan [cited 2014 Dec 2];16(3):1289–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803519
- 23. Duc I, On TI. Ho me o box ge nes : a mo le cu lar link bet we en de ve lop ment and can cer Ge nes ho me o box : uma re la ção mo le cu lar en tre o de sen vol vi men to e o cân cer. 2003;17(1):94–8.
- Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. Eur J Cancer [Internet]. 2005 Nov [cited 2015 Mar 9];41(16):2428–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199152
- 25. Schulze F, Chowdhury K, Zimmer A, Drescher U, Gruss P. The murine homeo box gene product, Hox 1.1 protein, is growth-controlled and associated with chromatin. Differentiation [Internet]. 1987 Jan [cited 2015]

Jul 2];36(2):130–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2452109

- Kongsuwan K, Webb E, Housiaux P, Adams JM. Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. EMBO J [Internet]. 1988 Jul [cited 2015 Jul 2];7(7):2131–8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=454515&tool=p mcentrez&rendertype=abstract
- Adams JM, Harris AW, Langdon WY, Klinken SP, Kongsuwan K, Alexander WS, et al. Lymphoid neoplasia and the control of haemopoietic differentiation. Ciba Found Symp [Internet]. 1989 Jan [cited 2015 Jul 2];142:54–64; discussion 65–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2568245
- Kongsuwan K, Allen J, Adams JM. Expression of Hox-2.4 homeobox gene directed by proviral insertion in a myeloid leukemia. Nucleic Acids Res [Internet]. 1989 Mar 11 [cited 2015 Jul 2];17(5):1881–92. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317530&tool=p mcentrez&rendertype=abstract
- Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. Int J Cancer [Internet]. 1992 Jul 30 [cited 2015 Jul 2];51(6):892–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379214
- Manohar CF, Furtado MR, Salwen HR, Cohn SL. Hox gene expression in differentiating human neuroblastoma cells. Biochem Mol Biol Int [Internet]. 1993 Jul [cited 2015 Jul 2];30(4):733–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104620
- Hromas R, Radich J, Collins S. PCR cloning of an orphan homeobox gene (PRH) preferentially expressed in myeloid and liver cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 1993 Sep 15 [cited 2015 Jul 2];195(2):976–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8103988
- Chariot A, Castronovo V. Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 1996 May 15 [cited 2015 Jul 2];222(2):292–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8670198
- Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. Mol Cell Biol [Internet]. 1996 Sep [cited 2015 Jul 2];16(9):4842–51. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231486&tool=p mcentrez&rendertype=abstract

- Gao AC, Isaacs JT. Expression of homeobox gene-GBX2 in human prostatic cancer cells. Prostate [Internet]. 1996 Dec [cited 2015 Jul 2];29(6):395–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977637
- De Vita G, Barba P, Odartchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G, et al. Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer [Internet]. 1993 Jan [cited 2015 Jul 2];29A(6):887–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8097920
- Rieger E, Bijl JJ, van Oostveen JW, Soyer HP, Oudejans 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 [Internet]. 1994 Sep [cited 2015 Jul 2];103(3):341–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915745
- Zhu F, Li J, Li W-X, Liu Z-C, Long X. Overexpression and clinicopathological significance of homeobox gene Quox-1 in oral squamous cell carcinoma. J Biochem Mol Biol [Internet]. 2004 Nov 30 [cited 2015 Jul 2];37(6):671–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607025
- Hassan NMM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. Oncol Res [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Jul 2];16(5):217–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294802
- Xavier FCA, Rodini CO, Paiva KBS, Destro MFSS, Severino P, Moyses RA, et al. ORAOV1 is amplified in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Nov 3];41(1):54–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623924
- Makarla PB, Saboorian MH, Ashfaq R, Toyooka KO, Toyooka S, Minna JD, et al. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. Clin Cancer Res [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2015 Jul 2];11(15):5365–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061849
- Agrawal S, Unterberg M, Koschmieder S, zur Stadt U, Brunnberg U, Verbeek W, et al. DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia. Cancer Res [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2015 Jun 24];67(3):1370–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283175
- 42. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. Int J Oral Maxillofac Surg [Internet]. 2006 Feb [cited 2015 Feb 9];35(2):101–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16154320

- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histonemodification maps. Nat Rev Genet [Internet]. 2007 Apr [cited 2014 Jul 13];8(4):286–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339880
- 44. Szyf M. DNA methylation and cancer therapy. Drug Resist Updat [Internet]. 2003 Dec [cited 2015 Mar 9];6(6):341–53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744498
- Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2009 Feb [cited 2015 Mar 12];66(4):596–612. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2780668&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. Nat Med [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 Jul 12];17(3):330–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21386836
- Lambert M-P, Herceg Z. Epigenetics and cancer, 2nd IARC meeting, Lyon, France, 6 and 7 December 2007. Mol Oncol [Internet]. 2008 Jun [cited 2015 Feb 22];2(1):33–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383327
- Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Jul 11];11(9):607– 20. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3711520&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 49. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Jan 5];1775(1):138–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045745
- Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. J Clin Invest [Internet].
 2000 Feb [cited 2015 Jul 2];105(4):401–7. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=289180&tool=p mcentrez&rendertype=abstract
- 51. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2015 Jul 2];97(5):1172–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222358
- 52. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite

regions during human hepatocarcinogenesis. Hepatology [Internet]. 2001 Mar [cited 2015 Jul 2];33(3):561–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230735

- Hershko AY, Kafri T, Fainsod A, Razin A. Methylation of HoxA5 and HoxB5 and its relevance to expression during mouse development. Gene [Internet]. 2003 Jan 2 [cited 2015 Jan 28];302(1-2):65–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527197
- Flagiello D, Poupon MF, Cillo C, Dutrillaux B, Malfoy B. Relationship between DNA methylation and gene expression of the HOXB gene cluster in small cell lung cancers. FEBS Lett [Internet]. 1996 Feb 12 [cited 2015 Jul 2];380(1-2):103–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603715
- Pathiraja TN, Nayak SR, Xi Y, Jiang S, Garee JP, Edwards DP, et al. Epigenetic reprogramming of HOXC10 in endocrine-resistant breast cancer. Sci Transl Med [Internet]. 2014 Mar 26 [cited 2014 Dec 2];6(229):229ra41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670685
- 56. Maier S, Nimmrich I, Koenig T, Eppenberger-Castori S, Bohlmann I, Paradiso A, et al. DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients--Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration wit. Eur J Cancer [Internet]. 2007 Jul [cited 2014 Dec 2];43(11):1679–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601725
- 57. Pilato B, Pinto R, De Summa S, Lambo R, Paradiso A, Tommasi S. HOX gene methylation status analysis in patients with hereditary breast cancer. J Hum Genet [Internet]. The Japan Society of Human Genetics; 2013 Jan [cited 2014 Dec 2];58(1):51–3. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2012.118
- Rodriguez BAT, Cheng ASL, Yan PS, Potter D, Agosto-Perez FJ, Shapiro CL, et al. Epigenetic repression of the estrogen-regulated Homeobox B13 gene in breast cancer. Carcinogenesis [Internet]. 2008 Jul [cited 2014 Dec 2];29(7):1459–65. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2899848&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Zhang R, Kang KA, Kim KC, Na S-Y, Chang WY, Kim GY, et al. Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. Gene [Internet]. 2013 Jul 25 [cited 2014 Nov 14];524(2):214–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618814
- 60. Pilozzi E, Onelli MR, Ziparo V, Mercantini P, Ruco L. CDX1 expression is reduced in colorectal carcinoma and is associated with promoter

hypermethylation. J Pathol [Internet]. 2004 Nov [cited 2014 Nov 26];204(3):289–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378566

- Wong NACS, Britton MP, Choi GS, Stanton TK, Bicknell DC, Wilding JL, et al. Loss of CDX1 expression in colorectal carcinoma: promoter methylation, mutation, and loss of heterozygosity analyses of 37 cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004 Jan 13 [cited 2014 Nov 26];101(2):574–9. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=327189&tool=p mcentrez&rendertype=abstract
- Suh ER, Ha CS, Rankin EB, Toyota M, Traber PG. DNA methylation down-regulates CDX1 gene expression in colorectal cancer cell lines. J Biol Chem [Internet]. 2002 Sep 27 [cited 2014 Dec 1];277(39):35795–800. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124393
- Kawai H, Tomii K, Toyooka S, Yano M, Murakami M, Tsukuda K, et al. Promoter methylation downregulates CDX2 expression in colorectal carcinomas. Oncol Rep [Internet]. 2005 Mar [cited 2014 Nov 24];13(3):547–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15706431
- Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, Fyfe MN, Campan M, Siegmund KD, et al. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. PLoS One [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Mar 18];6(6):e21443. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3121768&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Dietrich D, Hasinger O, Liebenberg V, Field JK, Kristiansen G, Soltermann A. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. Diagn Mol Pathol [Internet]. 2012 Jun [cited 2015 Mar 18];21(2):93–104. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22555092
- Montavon C, Gloss BS, Warton K, Barton CA, Statham AL, Scurry JP, et al. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. Gynecol Oncol [Internet]. 2012 Mar [cited 2015 Mar 18];124(3):582–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115852
- Su H-Y, Lai H-C, Lin Y-W, Chou Y-C, Liu C-Y, Yu M-H. An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer. Int J Cancer [Internet]. 2009 Jan 15 [cited 2015 Mar 18];124(2):387–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942711
- 68. Cheng W, Jiang Y, Liu C, Shen O, Tang W, Wang X. Identification of aberrant promoter hypomethylation of HOXA10 in ovarian cancer. J Cancer Res Clin Oncol [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Mar

18];136(8):1221–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20151152

- 69. Wang L, Chen S, Xue M, Zhong J, Wang X, Gan L, et al. Homeobox D10 gene, a candidate tumor suppressor, is downregulated through promoter hypermethylation and associated with gastric carcinogenesis. Mol Med [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Mar 18];18:389–400. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3356424&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 70. Zhang J-F, Zhang J-G, Kuai X-L, Zhang H, Jiang W, Ding W-F, et al. Reactivation of the homeotic tumor suppressor gene CDX2 by 5-aza-2'deoxycytidine-induced demethylation inhibits cell proliferation and induces caspase-independent apoptosis in gastric cancer cells. Exp Ther Med [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Mar 18];5(3):735–41. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3570199&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Ma J, Wang J-D, Zhang W-J, Zou B, Chen W-J, Lam CSC, et al. Promoter hypermethylation and histone hypoacetylation contribute to pancreatic-duodenal homeobox 1 silencing in gastric cancer. Carcinogenesis [Internet]. 2010 Sep [cited 2015 Mar 18];31(9):1552–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20622005
- Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. J Clin Oncol [Internet]. 1999 May [cited 2015 Feb 19];17(5):1499–507. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334537
- 73. Truong M, Yang B, Wagner J, Kobayashi Y, Rajamanickam V, Brooks J, et al. Even-skipped homeobox 1 is frequently hypermethylated in prostate cancer and predicts PSA recurrence. Br J Cancer [Internet]. 2012 Jun 26 [cited 2015 Mar 18];107(1):100–7. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3389415&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 74. Tada Y, Yokomizo A, Shiota M, Tsunoda T, Plass C, Naito S. Aberrant DNA methylation of T-cell leukemia, homeobox 3 modulates cisplatin sensitivity in bladder cancer. Int J Oncol [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 Nov 18];39(3):727–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617853
- Di Vinci A, Casciano I, Marasco E, Banelli B, Ravetti GL, Borzì L, et al. Quantitative methylation analysis of HOXA3, 7, 9, and 10 genes in glioma: association with tumor WHO grade and clinical outcome. J Cancer Res Clin Oncol [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Mar 18];138(1):35–47. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947269

- 76. Waraya M, Yamashita K, Katoh H, Ooki A, Kawamata H, Nishimiya H, et al. Cancer specific promoter CpG Islands hypermethylation of HOP homeobox (HOPX) gene and its potential tumor suppressive role in pancreatic carcinogenesis. BMC Cancer [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Mar 18];12:397. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3488580&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 77. Guo M, House MG, Suzuki H, Ye Y, Brock M V., Lu F, et al. Epigenetic silencing of CDX2 is a feature of squamous esophageal cancer. Int J Cancer [Internet]. 2007 Sep 15 [cited 2015 Mar 18];121(6):1219–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534889
- 78. Guerrero-Preston R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-López L, Macía-Colón G, et al. NID2 and HOXA9 promoter hypermethylation as biomarkers for prevention and early detection in oral cavity squamous cell carcinoma tissues and saliva. Cancer Prev Res (Phila) [Internet]. 2011 Jul [cited 2015 Mar 19];4(7):1061–72. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131432&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 79. Terribas E, Garcia-Linares C, Lázaro C, Serra E. Probe-based quantitative PCR assay for detecting constitutional and somatic deletions in the NF1 gene: application to genetic testing and tumor analysis. Clin Chem [Internet]. 2013 Jun [cited 2015 Feb 6];59(6):928–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386700
- Yu Y-H, Morales J, Feng L, Lee JJ, El-Naggar AK, Vigneswaran N. CD147 and Ki-67 overexpression confers poor prognosis in squamous cell carcinoma of oral tongue: a tissue microarray study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol [Internet]. 2015 May [cited 2015 Jul 8];119(5):553–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747176
- Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol [Internet]. 1993 Feb [cited 2015 Jul 7];120(3):577–85. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119550&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 82. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science [Internet]. 1997 Apr 4 [cited 2015 Mar 1];276(5309):75–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082989
- Bernstein LR, Liotta LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. Curr Opin Oncol [Internet]. 1994 Jan [cited 2015 Jul 7];6(1):106–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515692

- Chen Q, Lipkina G, Song Q, Kramer RH. Promoter methylation regulates cadherin switching in squamous cell carcinoma. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2014 Dec 9];315(4):850–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985090
- Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. Int J Cancer [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2014 Dec 9];93(5):667–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477576
- Calmon MF, Rodrigues R V, Kaneto CM, Moura RP, Silva SD, Mota LDC, et al. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. Neoplasia [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Dec 9];11(12):1329–39. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794514&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Chang X, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, Chang SS, Zhong X, et al. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. Cancer Res [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2014 Dec 8];70(7):2870–9. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849007&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Rahman MM, Qian ZR, Wang EL, Yoshimoto K, Nakasono M, Sultana R, et al. DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b overexpression and clinical significance in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Hum Pathol [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Jul 8];41(8):1069–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381114
- 89. ONLINE ANALYSIS > PREDICTION [Internet]. [cited 2015 Jul 13]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx
- 90. Yong ZWE, Zaini ZM, Kallarakkal TG, Karen-Ng LP, Rahman ZAA, Ismail SM, et al. Genetic alterations of chromosome 8 genes in oral cancer. Sci Rep [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Jul 13];4:6073. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4133705&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 91. Järvinen A-K, Autio R, Kilpinen S, Saarela M, Leivo I, Grénman R, et al. High-resolution copy number and gene expression microarray analyses of head and neck squamous cell carcinoma cell lines of tongue and larynx. Genes Chromosomes Cancer [Internet]. 2008 Jun [cited 2015 Jun 20];47(6):500–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314910
- 92. Le Tourneau C, Velten M, Jung G-M, Bronner G, Flesch H, Borel C. Prognostic indicators for survival in head and neck squamous cell carcinomas: analysis of a series of 621 cases. Head Neck [Internet]. 2005

Sep [cited 2015 Jul 13];27(9):801–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086415

- 93. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin [Internet]. Jan [cited 2014 Jul 11];55(2):74–108. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078
- 94. Pojo M, Gonçalves CS, Xavier-Magalhães A, Oliveira AI, Gonçalves T, Correia S, et al. A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. Oncotarget [Internet]. 2015 Apr 10 [cited 2015 Jul 13];6(10):7657–74. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4480707&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Carrio M, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. Cancer Res [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2015 Jul 13];65(16):7177–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103068
- 96. Wagner JR, Busche S, Ge B, Kwan T, Pastinen T, Blanchette M. The relationship between DNA methylation, genetic and expression interindividual variation in untransformed human fibroblasts. Genome Biol [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Feb 18];15(2):R37. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4053980&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 97. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, et al. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. Genome Biol [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jul 11];12(1):R10. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3091299&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? Nat Rev Cancer [Internet]. 2002 Oct [cited 2013 Jun 13];2(10):777–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360280
- Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. Eur J Cancer [Internet]. 2005 Nov [cited 2013 Jun 24];41(16):2428–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199152
- 100. Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. Cancer Biol Ther [Internet]. 2007 Aug [cited 2014 Dec 8];6(8):1284–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660710

- 101. Ding Y-B, Long C-L, Liu X-Q, Chen X-M, Guo L-R, Xia Y-Y, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine leads to reduced embryo implantation and reduced expression of DNA methyltransferases and essential endometrial genes. PLoS One [Internet]. 2012 Jan 28 [cited 2015 Feb 9];7(9):e45364. Available from: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045364
- 102. Daniel FI, Rivero ERC, Modolo F, Lopes TG, Salum FG. Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a and 3b in oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. Arch Oral Biol [Internet]. 2010 Dec [cited 2015 Jul 10];55(12):1024–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951977
- 103. Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. Clin Cancer Res [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2015 Jul 10];9(12):4415–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555514
- 104. Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, et al. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. Am J Pathol [Internet]. 2004 Feb [cited 2015 Jul 10];164(2):689–99. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1602280&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 105. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg P V, Laird PW. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. Cancer Res [Internet]. 1999 May 15 [cited 2015 Jul 10];59(10):2302–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10344733
- 106. Patra SK, Patra A, Zhao H, Dahiya R. DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. Mol Carcinog [Internet]. 2002 Mar [cited 2015 Jul 10];33(3):163–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870882
- 107. Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. Int J Cancer [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2015 Jul 10];105(4):527–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712445
- 108. Lin R-K, Hsu H-S, Chang J-W, Chen C-Y, Chen J-T, Wang Y-C. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. Lung Cancer [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Jul 10];55(2):205–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140695

- Baubec T, Colombo DF, Wirbelauer C, Schmidt J, Burger L, Krebs AR, et al. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. Nature [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2015 Jan 21 [cited 2015 Jan 21];advance on. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature14176
- 110. Versmold B, Felsberg J, Mikeska T, Ehrentraut D, Köhler J, Hampl JA, et al. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene PROX1 in sporadic breast cancer. Int J Cancer [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2014 Dec 2];121(3):547–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415710
- Von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. Int J Mol Med [Internet]. 2004 Nov [cited 2015 Jul 10];14(5):807–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492849
- 112. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. Oral Oncol [Internet]. 2004 Feb [cited 2015 Jul 10];40(2):145–53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693237
- 113. Maruya S, Issa J-PJ, Weber RS, Rosenthal DI, Haviland JC, Lotan R, et al. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. Clin Cancer Res [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2015 Jul 10];10(11):3825–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173091
- 114. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. Cancer Res [Internet]. 2002 Sep 15 [cited 2015 Jul 10];62(18):5295–300. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234999
- 115. Murria R, Palanca S, de Juan I, Egoavil C, Alenda C, García-Casado Z, et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. Am J Cancer Res [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Jul 11];5(1):375–85. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4300703&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 116. Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, Lakins JN, Gbegnon MK, Clemmer VB, et al. HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. J Clin Invest [Internet]. 2010 May [cited 2015 Jul 13];120(5):1535–50. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2860938&tool= pmcentrez&rendertype=abstract

117. Uchida K, Veeramachaneni R, Huey B, Bhattacharya A, Schmidt BL, Albertson DG. Investigation of HOXA9 promoter methylation as a biomarker to distinguish oral cancer patients at low risk of neck metastasis. BMC Cancer [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Jan 23];14:353. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045880&tool=

pmcentrez&rendertype=abstract

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo Nº 181/2010 CAAE: 0007.0.017.000-10

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "Análise genética, epigenética e funcional de genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Flávia Caló de Aquino Xavier sob orientação do(a) Prof.(a.) Dr.(a.) Fabio Daumas Nunes.

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

São Paulo, 24 de novembro de 2010.

01/12/2017

20 de

22

Profa. Dra. Mareia Turolla Wanderley Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". São Paulo - SP - CEP 05508-900 - Tel. (0XX11) 3091-7960

ANEXO B

Caso	Idade	Sexo	Local	рТ	рN	Recidiva	2º Tumor	Dif Histol	IS	IL	IP	Seguimento	Evento
529T	58	М	Língua	4A	2C	Não		MD	Não	Não	Sim	901	0
524T	59	М	Língua	2	0	Não		MD	Não	Não	Sim	771	0
518T	50	М	Assoalho	2	2B	Não		MD	Não	Não	Não	733	0
546T	46	М	Língua	3	2b			MD	Não	Sim	Não	377	1
547T	53	М	Assoalho	1	0		sim					596	0
592T	61	М	Língua	1	0	Não		BD	Não	Não	Não	586	0
639T	83	F	Assoalho									346	1
613T	56	М	Língua	1	2B	Não		BD	Não	Não	Sim	543	0
611T	62	М	Língua	3	2C	Não		MD	Não	Não	Sim	530	0
600T	72	М	Língua	4A	2C	Sim		MD	Não	Não	Sim	607	0
634T	59	М	Assoalho	3	2C	Não		MD	Não	Não	Sim	148	0
487T	47	m	Língua	4A	2C	Não		BD	Sim	Sim	Sim	1020	0
541T	64	М	Assoalho	1	Х	Não			Não	Não	Não	691	0
579T	65	М	Assoalho	1	0	Não						684	0
597T	59	М	Língua			Não						468	0
575T	59	F	Língua	2	2C	Não		PD	Não	Não	Não	659	0
650T													
652T	63	М	Assoalho	1	1	Não		MD	Sim	Sim		134	0
689T	77	М	Língua	1	0			MD	Não	Não	Não	74	1
648T	70	М	Língua					MD				42	1
572T	61	М	Língua	2	0	Não		BD	Sim	Sim	Sim	719	0
578T	63	М	Língua	4A	0			MD	Não	Não	Sim	218	1
619T	61	F	Assoalho	2	0	Não		PD	Não	Não	Não	477	0

pT: Tamanho tumoral pelo pTNM; pN: comprometimento linfonodal pelo pTNM; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado; Dif Histol: diferenciação histológica; IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural; Evento 0: vivo; Evento 1: morte pela neoplasia
Casos	Local	TNM	Dif Histol	IS	IP	IL	Seguimento	Evento
CP3/0046	Língua	T2N2B	MD	Não	Não	Não	818	1
CP3/0033	Assoalho	T3N0	MD	Não	Presente	Não	2054	0
CP3/0280	Assoalho	T1N2B	MD	Não	Presente	Não	1105	0
CP3/0292	Assoalho	T2N2C	MD	Não	Presente	Não	257	1
CP3/0358	Assoalho	T4N0	BD	Não	Presente		1282	0
CP3/0139	Língua	T2N2A	MD					
CP3/0193	Língua	T2N1	BD					
CP3/0017	Língua	T2N1	MD	Não	Não	Não	600	1
CP3/0083	Língua	T1N1	MD	Não	Não	Presente	1436	0
CP3/0087	Língua	T2N2C	MD	Não	Presente	Não	1366	0
CP3/0094	Assoalho	T4N0	BD	Presente	Presente	Presente	416	1
CP3/0293	Língua	T3N0	BD	Não	Presente	Não	738	0
CP3/0397	Assoalho	T2N2C	MD	Não	Não		353	0
CP3/0452	Todos	T4N0	BD	Não	Não	Não	157	0
CP3/0468	Assoalho	T2N2B	MD	Não	Não		228	0
CP3/0484	Língua	T2N2B	MD	Presente	Não	Presente	117	0
CP3/0486	Língua	T3N0	BD	Não	Presente	Não		
CP3/0410	Língua	T1N1	MD	Não			204	0
CP3/216	Língua	T1N0	BD	Não	Não	Não	588	1
CP3/419	Língua	T1N0	MD		Não	Não	160	0
CP3/432	Assoalho	T1N0	BD		Não			
CP3/472	Assoalho	T4N0	MD	Presente	Não	Presente	70	0

Dif Histol: diferenciação histológica; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado; IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural; Evento 0: vivo; Evento 1: morte pela neoplasia

ANEXO D

Caso	Resultado	Sexo	Idade	TNM	LOCALIZAÇÃO	IS	IL	IP	EVENTO
CP3/0008	positivo	Μ	54	T1N0M0	soalho anterior de boca	Ausente	Ausente	Ausente	0
CP3/0015	positivo	Μ	57	T4N2CM0	soalho de boca + lingua	Ausente	Ausente	Presente	1
CP3/0029	positivo	Μ	50	T2N0M0	assoalho de boca + lingua	Ausente	Ausente	Presente	0
CP3/0120	negativo	F	46	T2N0M0	lingua	Ausente	Ausente	Ausente	1
CP3/0138	positivo	Μ	75	T2N0M0	assoalho de boca	Ausente	Ausente	Ausente	0
CP3/0166	positivo	Μ	54	T1N0M0	soalho de boca	Ausente	Ausente	Presente	1
CP3/0172	positivo	Μ	55	T4N2CM0	soalho de boca	Ausente	Presente	Presente	0
CP3/0182	negativo	Μ	54	T4N1M0	soalho de boca	Ausente	Presente	Ausente	1
CP3/0187	negativo	Μ	59	T2N0M0	soalho de boca	Ausente	Ausente	Presente	0
CP3/0192	positivo	Μ	51	T2N0M0	soalho de boca	Ausente	Ausente	Presente	1
CP3/0234	positivo	Μ	55	T4N1M0	assoalho de boca	Presente	Presente	Presente	1
CP3/0280	negativo	Μ	52	T1N2B	Soalho de boca	Ausente	Ausente	Presente	0
CP3/0349	negativo	Μ	59	T4AN2B	Lingua+ Assoalho	Ausente		Presente	1
CP3/0356	negativo	Μ	56	T4AN3	Assoalho + lingua	Presente		Presente	1
CP3/0449	positivo	Μ	57	T2N2B	Língua, base de língua	Ausente	Ausente	Ausente	0
CP3/0455	negativo	Μ	59	T4AN1	Soalho de boca a direita	Ausente	Ausente	Ausente	1
CP3/0462	positivo	Μ	57	T1N2B	Soalho de boca	Presente	Presente	Ausente	0
CP3/0541	negativo	Μ	64	T1NX	língua e soalho	Ausente	Ausente	Ausente	0
CP3/0547	positivo	М	53	T1SNX	soalho de boca e ventre lingual	Nao- Avaliavel	Nao- Avaliavel	Nao- Avaliavel	0
CP3/0548	positivo	М	47	T2N2B	borda lateral de língua à direita, soalho de boca	Ausente	Presente	Nao- Avaliavel	0
CP3/0652	negativo	М	63	T1N1	Soalho de boca	Presente	Presente	Nao- Avaliavel	0
CP3/0708	positivo	Μ	55	T2N0	Soalho à D	Ausente	Ausente	Presente	0
CP3/0709	positivo	Μ	64	T2N2B	Língua E	Presente	Ausente	Presente	0
CP3/0732	negativo	Μ	65	T4AN9MX	Boca - Lingua + Soalho	Ausente	Presente	Presente	0
CP3/0737	negativo	М	52	T4AN2B	Lingua + Soalho	Presente	Ausente	Presente	0

IS: infiltração sanguínea; IL: infiltração linfática; IP: infiltração perineural; Evento 0: vivo; Evento 1: morte pela neoplasia