**ROBSON DOS SANTOS CORDEIRO**

# Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina

São Paulo

2018

**ROBSON DOS SANTOS CORDEIRO**

# Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina

**Versão Corrigida**

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

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2018

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

Cordeiro, Robson dos Santos.
Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina / Robson dos Santos Cordeiro ; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2018.
81 p. : tab., fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida

1. Carcinoma mucoepidermoide bucal. 2. Genes homeobox. 3. Cisplatina. 4. PROX1. 5. MEIS1. 6. HOXB7. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Cordeiro RS. Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências

Aprovado em: 21 /02/2019

**Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a). Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Instituição: FO-USP Julgamento: aprovado

Prof(a). Dr(a). Profa. Dra. Camila de Barros Gallo

Instituição: FO-USP Julgamento: aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

Instituição: Universidade Nove de Julho Julgamento: aprovado

*Aos meus pais, pela bondade,*

*pelo carinho, pela dedicação e,*

*principalmente, pelo amor,*

*que transpõe qualquer nível de distância.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Professor Dr. Fabio Daumas Nunes** pela oportunidade a mim concedida para desenvolver este trabalho e pela confiança em mim depositada. Agradeço pela orientação, pelo convívio, pela amizade, pela paciência, pelos conselhos e por todo conhecimento transmitido.

À pesquisadora e amiga **Prof. Dra. Lucyene Miguita Luiz**, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho, pois foi de fundamental importância desde a idealização do projeto. Agradeço pelos conselhos, pela generosidade, pela disponibilidade, pelo empenho, pelos ensinamentos transmitidos e por sempre acreditar e me fazer acreditar que era possível.

À pesquisadora **Prof. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues**, pois sempre esteve disposta a contribuir com este trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Prof. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, pela colaboração e contribuição para com este trabalho.

Aos Professores do departamento da Patologia Oral **Prof. Dra. Marília Trierveiler Martins**, **Prof. Dra Marina Helena Cury Gallottini**, **Prof. Dra Karem Lopez Ortega**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior**. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos, por sempre estarem disponíveis e pela convivência harmoniosa.

Ao **Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör**, por gentilmente ter cedido as células utilizadas para os experimentos contidos nesta dissertação.

Aos amigos e pesquisadores **Sofia**, **Emilia**, **Marcos**, **Guilherme**, **Nathália**, **Lilia**, **Letícia**, **Nataly**, **Dani** e **Júlia**. Agradeço pela convivência harmoniosa, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e por tornar o dia a dia mais leve e prazeroso.

Aos amigos do programa de pós-graduação **Gustavo**, **Raíssa**, **Roberta**, **Andressa**, **Wellington**, **Solange**, **Karini**, **Rodrigo**, **Aline**, **Letícia**, **Stephanie**, **Nayara**, **Gabriela**, **Samanta** e **Karina** pelas conversas mais aleatórias possíveis e pela convivência.

Aos técnicos de laboratório **Juvani**, **Adriana**, **Elisa** e **Edna** que sempre foram atenciosos e solícitos. Muito obrigado pelo auxílio e pela convivência.

Aos secretários do departamento de patologia oral **Vinícius** e **Carlito** pela disponibilidade, paciência e atenção.

Ao meu namorado **João Batista Neto**, pelo amor, pelo companheirismo, pelo incentivo e pela paciência. Agradeço imensamente por fazer parte da minha vida.

Aos meus irmãos **Rosana**, **Roberto**, **Regina** e **Regiane** por me mostrarem o caminho correto a se seguir e por sempre estarem dispostos a me auxiliar.

Aos amigos **Ewerton Campêllo** e **Michelle Gomes**, pela amizade, companheirismo, confiança e por sempre acreditarem em mim.

À **Gail Farrell**, pela recepção, pelos ensinamentos, pelo amor e por ser essa pessoa maravilhosa de coração gigante. Agradeço por ter feito parte da minha vida e ter me feito uma pessoa melhor.

Às bibliotecárias **Glauci** e **Vânia**, pela atenção, carinho e dedicação.

Aos companheiros **P**. **Joaquim**, **Dillan** e **Luna**, agradeço por sempre estarem presentes, pelo amor e carinho incondicional.

Aos **Pacientes** que doaram suas células para o progresso da ciência, pois sem este gesto, a realização deste trabalho não seria possível.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP**. Agradeço imensamente por me receber desde 2010 como aluno de graduação e, posteriormente, como aluno de pós-graduação. Tenho um profundo e imenso amor e carinho por essa casa onde tive a oportunidade de viver excelentes momentos da minha vida.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de mestrado a mim concedida. Número do processo 131265/2017-2.

*“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”*

Aristóteles

# RESUMO

Cordeiro RS. Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum, e com maior frequência de metástase linfonodal. Alterações genéticas estão intimamente associadas à carcinogênese e, também, aos processos de metástase tumoral. Para o CME o tratamento de escolha mais aplicado hoje é a cirurgia seguida de radioterapia, pois a quimioterapia não tem mostrado muita eficiência para o tratamento destas neoplasias. Entre os quimioterápicos mais prescritos para o tratamento de cânceres encontra-se a cisplatina, à base de platina, que atua no DNA da célula, induzindo a apoptose. Pouco se sabe a respeito de seu mecanismo de ação sobre o CME, inclusive sobre os genes homeobox. Estes genes compreendem uma família grande e essencial de reguladores do desenvolvimento que são vitais para o crescimento e diferenciação celular, e a expressão anômala destes genes têm sido implicados na carcinogênese. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão dos genes homeobox em células derivadas de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina. Os genes avaliados neste trabalho foram: *PROX1, MEIS1, HOXB5, HOXB7 e HOXB9* por RT-qPCR. Previamente, as linhagens celulares derivadas de carcinoma mucoepidermoide UM-HMC1 UM-HMC2 e UM-HMC3A foram tratadas com a cisplatina por 24h e posteriormente submetidas aos ensaios de RT-qPCR. Adicionalmente, as amostras tratadas e sem tratamento foram analisadas pelo ensaio de formação de esferas e ensaio de ferida para verificar o efeito da cisplatina sobre propriedades relacionadas às células quimiorresistentes (putativas células tronco tumorais). Como resultados, entre os genes analisados foram expressos *PROX1, MEIS1* e *HOXB7.* A UM-HMC3A apresentou maior expressão destes genes que as demais linhagens. Os genes *HOXB5* e *HOXB9* não foram expressos nas linhagens analisadas. A cisplatina reduziu a expressão de *MEIS1* e aumentou a expressão de *HOXB7*, em todas as linhagens. O gene *PROX1* apresentou expressão variável entre as linhagens, sendo expresso na UM-HMC1 apenas quando são tratadas com cisplatina e reduzido nas UM-HMC2 e UM-HMC3A tratadas. O número de esferas formadas não apresentou diferença significativa para UM-HMC1 e UM-HMC3A, o número de esferas aumentou na linhagem UM-HMC2 tratada com cisplatina. No

ensaio de ferida, a cisplatina foi capaz de reduzir a migração celular em todas as linhagens quando comparadas com seus controles. Os resultados sugerem que o *PROX1* e *HOXB7* podem estar relacionados com carcinomas mucoepidermoides mais invasivos, enquanto que o *MEIS1* pode estar relacionado à carcinogênese e autorrenovação tumoral. A cisplatina é capaz de afetar a expressão dos genes homeobox *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7*, os quais foram encontrados nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide analisados. A cisplatina não afeta as células formadoras de esferas, mas reduzir a migração das linhagens de carcinoma mucoepidermoide.

Palavras-chave: Carcinoma mucoepidermoide bucal. Homeobox. Cisplatina. *PROX1*. *MEIS1*. *HOXB7*.

**ABSTRACT**

Cordeiro RS. Evaluation of homeobox gene expression in cisplatin-treated mucoepidermoid carcinoma cells [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Corrected version.

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant neoplasm of salivary gland and presents higher frequency of lymph node metastasis. Genetic alterations are closely associated with carcinogenesis and also with processes of tumor metastasis. For MEC the treatment of choice most applied today is surgery followed by radiotherapy, since chemotherapy has not shown much efficiency for the treatment of these neoplasms. Among the most commonly prescribed chemotherapic drugs for cancer treatment is platinum-based cisplatin, which acts on the cell's DNA, inducing apoptosis. There is no information in the literature regarding its action mechanism on MEC including homeobox genes. These genes comprise a large and essential family of developmental regulators that are vital for cell growth and differentiation and the anomalous expression of these genes have been implicated in carcinogenesis. Therefore, this work aimed to evaluate the expression of the homeobox genes in cells derived from mucoepidermoid carcinoma treated with cisplatin. The genes evaluated in this work were: PROX1, MEIS1, HOXB5, HOXB7 and HOXB9 by RT-qPCR. Previously, cell lines derived from mucoepidermoid carcinoma UM-HMC1 UM-HMC2 and UM-HMC3A were treated with cisplatin for 24h and subsequently subjected to the RT-qPCR assays. In addition, treated and untreated samples were analyzed by the sphere-forming assay and wound assay to verify the effect of cisplatin on chemo resistant cell-related (putative tumor stem cell) properties. As results, *PROX1*, *MEIS1* and *HOXB7* were expressed among the analyzed genes. UM-HMC3A showed higher expression of these genes than the other lineages. The *HOXB5* and *HOXB9* genes were not expressed in the analyzed lineages. Cisplatin reduced *MEIS1* expression and increased *HOXB7* expression in all lineages. The PROX1 gene showed variable expression between the lineages, being expressed in UM-HMC1 only when treated with cisplatin and reduced in treated UM-HMC2 and UM-HMC3A. The number of spheres formed did not show significant difference for UM-HMC1 and UM-HMC3A, the number of spheres

increased in the cisplatin-treated UM-HMC2 lineage. In the wound assay, cisplatin was able to reduce cell migration in all lineages when compared to their controls. The results suggested that *PROX1* and *HOXB7* may be related to more invasive mucoepidermoid carcinoma, while MEIS1 be related to its carcinogenesis and selfrenew tumoral capacity. Cisplatin is capable to affect the expression of the homeobox genes *PROX1*, *MEIS1* and *HOXB7*, which were found in the mucoepidermoid carcinoma cell lines analyzed. Cisplatin does not affect sphere formation of cells, but seems to reduce the migration of mucoepidermoid carcinoma lineages.

Keywords: Oral mucoepidermoid carcinoma. Homeobox. Cisplatin. PROX1. MEIS1. HOXB7.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Organização genômica e distribuição dos genes HOM na Drosófila, dos grupos *HOX* em humanos e de um hipotético complexo ancestral. Os quatro complexos *HOX* em humanos são mostrados com seus grupos homólogos e a direção da transcrição. Cada gene é representado por um quadrado de cor diferente (retirado de MARK et al., 1997).....30

Figura 2.2 - Diagrama esquemático e estrutura de domínio de proteína do *PROX1*. O código de cores é usado para destacar a região codificadora do gene (preto), das partes não codificadoras (cinza). Diferentes partes funcionais da proteína são indicadas, incluindo o homeodomínio, o domínio próspero e as caixas receptoras nucleares. A ilustração também indica qual região da proteína é codificada por cada um dos cinco éxons individuais. A numeração de nucleotídeos e aminoácidos refere-se ao *PROX1* humano (AL606537, GI: 17154354 (www.ncbi.nlm.nih.gov) PROX1-202 ENST00000435016 (www.ensemble.org).....37

Tabela 4.5 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizadas para os RT-qPRCs.....46

Figura 5.1. Padrão de expressão gênica de *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7* nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar. A, linhagem UM-HMC1. B, linhagem UM-HMC2. C, linhagem UM-HMC3A. Valores normalizados relativo ao gene constitutivo. ($^{**}p<0,002$; $^{****}p<0.0001$, por ANOVA).....51

Figura 5.2 - Expressão dos genes homeobox PROX1, MEIS1 e HOXB7 nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide não tratadas com cisplatina (Controle). A, B e C gráficos com as expressões relativas normalizadas. A, PROX1. B, MEIS1. C, HOXB7. ($^{*}p<0,05$; $^{**}p<0,001$; $^{***}p<0,0003$).....52

Figura 5.3 - Expressão dos genes homeobox *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7* nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide tratadas (Cisplatina) e não tratadas (Controle) com cisplatina. A, B e C gráficos com as expressões relativas normalizadas. A, expressão do gene *PROX1*. B, expressão do gene *MEIS1*. C, expressão do gene *HOXB7*. ($^{*}p<0,05$; $^{****}p<0,0001$).....54

Figura 5.4 - Ensaio de capacidade de formação de esferas em linhagens de carcinoma mucoepidermoide tratadas (Cisplatina) e não tratadas (Controle) com cisplatina. A, B e C, imagens fotomicroscópicas das áreas representativas das esferas formadas pelas linhagens UM-HMC1 (A), UM-HMC2 (B) e UM-HMC3A (C) 14 dias após o plaquamento das células em placas de 24 poços de baixa aderência, do grupo controle e grupo cisplatina. [Objetiva de 4x]. E, F e G gráfico com o número médio de esferas formadas no 14º dia do ensaio. E, linhagem UM-HMC1. F, linhagem UM-HMC2. G, linhagem UM-HMC3A. (***p<0.0003).....56

Figura 5.5 - Migração celular de linhagens de carcinoma mucoepidermoide tratadas (Cisplatina) e não tratadas (Controle) com cisplatina. A, B e C, imagens fotomicroscópicas das áreas de ferida das células UM-HMC1 (A), UM-HMC2 (B) e UM-HMC3A (C) no momento 0 horas e 24horas, dos grupos controle e grupo cisplatina. [Objetiva de 4x]. E, F e G gráfico com a porcentagem de área preenchida com células migratórias no período de 24horas. E, linhagem UM-HMC1. F, linhagem UM-HMC2. G, linhagem UM-HMC3A. (**p<0.001; ***p<0,0008).....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| C | Célsius |
| CD105 | Grupamento de diferenciação-105 (do inglês, Cluster of Differentiation 105) |
| cDNA | DNA complementar |
| Cis | Cisplatina |
| $CO_2$ | Dióxido de carbono |
| *CRTC1-3* | *Gene Co-regulador de Transcrição Regulada 1-3 (do inglês; CREB Regulated Transcription Coactivator 1)* |
| Ct | Ciclo limiar (do inglês; threshold cycle) |
| DEMEM | Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic acid) |
| | DNase Desoxiribonuclease |
| EGF | Fator de crecimento epitelial (do inglês; epidermal growth factor) |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epitelial (do inglês; Epidermal growth factor receptor). |
| EMT | Transição epitélio-mesênquima (do inglês, epithelial–mesenchymal transition) |
| *ERβ* | *Receptor de estrógeno β (*do inglês; *Estrogen receptor β)* |
| FBS | Soro fetal bovino (do inglês; foetal bovine sérum) |
| G | Força gravitacional. |
| h | Horas |
| *Hmx3* | *Gene Homeobox* H6 da família número 3 (do inglês; *Homeobox H6* Family Member3) |
| *HOM* | Complexo homeótico (do inglês; Homeotic complex) |
| *HOM-C* | Complexo homeótico C (do inglês; Homeotic complex C) |
| *HOX* – | Gene Homeobox |
| *HOXA* | *Gene Homeobox A* |
| *HOXA7* | *Gene Homeobox A7* |
| *HOXA9* | *Gene Homeobox A9* |
| *HOXB* | *Gene Homeobox B* |
| *HOXB7* | *Gene Homeobox B7* |

| | |
|---|---|
| *HOXB9* | *Gene Homeobox B9* |
| *HOXC* | *Gene Homeobox C* |
| *HOXD* | *Gene Homeobox D* |
| *HPRT* | *Gene Hypoxanthine Phosphoribosyl transferase* |
| L | Litro |
| M | Molar |
| *MAML2* | *Gene Mastermind-like2* |
| *MEIS1* | *Gene Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1* |
| *MEIS2* | *Gene Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 2* |
| Min | Minuto |
| m | Mili |
| ng | Nanograma |
| nM | Nanomolar |
| p | Pequeno (do francês; *petit)* |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato (do inglês; phosphate buffered saline) |
| *PBX* | *Gene Pre-B-Cell Leukemia Homeobox* |
| *PBX3* | *Gene Pre-B-Cell Leukemia Homeobox3* |
| pH | Potencial de hidrogenação ou Potencial do hidrônio |
| *PROX1* | *Gene Prospero Homeobox 1* |
| q | Calda (do francês; *queue*c) |
| RNA | Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*) |
| RNase | Ribonuclease |
| RT-qPCR. | *Quantificação em tempo real da reação da polimerase em cadeia (do inglês, Real time quantitative Polymerase chain reaction)* |
| seg | Segundo |
| *Six1* | *Gene SIX Homeobox 1* |
| TALE | Porção terminal (do inglês; tale) |
| TGFβ | Fator de transformação do crescimento-β (do inglês, Transforming growth factor) |
| UM-HMC-1 | Universidade de Michigan-Carcinoma Mucoepidermoide Humano 1 (do inglês; University of Michigan-Human mucoepidermoid carcinoma 1) |

UM-HMC-2 Universidade de Michigan-Carcinoma Mucoepidermoide Humano 2 (do inglês; University of Michigan-Human mucoepidermoid carcinoma 2)

UM-HMC-3A Universidade de Michigan-Carcinoma Mucoepidermoide Humano 3A (do inglês; University of Michigan-Human mucoepidermoid carcinoma 3A)

V Volt

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| $^{-/-}$ | Nocaute gênico |
| ° | Grau |
| % | Porcentagem |
| µ | Micro |
| xg | Vezes força gravitacional |
| Δ | Delta (variação) |
| < | Menor |
| ± | Margem de erro do desvio padrão, para mais ou para menos |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** ..... 25
**2 REVISÃO DA LITERATURA** ..... 27
**2.1 Tumores de cabeça e pescoço e carcinoma mucoepidermoide** ..... 27
**2.2 Os genes Homeobox** ..... 28
**2.3 Os genes homeobox e o câncer** ..... 31
2.3.1 HOXB5, HOXB7, HOXB9 ..... 33
2.3.2 MEIS1 ..... 34
2.3.3 PROX1 ..... 36
2.4 Cisplatina ..... 39
**3 OBJETIVO GERAL** ..... 41
**3.1 Objetivos específicos** 41
**4 METODOLOGIA** ..... 43
**4.1 Cultivo celular** ..... 43
**4.2 Tratamento com cisplatina** ..... 44
**4.3 Isolamento do RNA** ..... 44
**4.4 Síntese de DNA complementar** ..... 45
**4.5 PCR quantitativo em tempo Real (qPCR)** ..... 46
**4.6 Ensaio de formação de esferas** ..... 47
**4.7 Ensaio migração celular (Ferida)** ..... 47
**4.8 Análise estatística** ..... 49
**5 RESULTADOS** ..... 51
**5.1 Expressão de genes homeobox em linhagens de carcinoma mucoepidermoide** ..... 51
**5.2 Perfil de expressão de genes homeobox em carcinoma mucoepidermoide tratado e não com cisplatina.** ..... 52
**5.3 Análise da capacidade de formação de esferas pós tratamento com cisplatina.** ..... 55
**5.4 Análise da capacidade de migração celular por ensaio de ferida.** ..... 57
**6 DISCUSSÃO** ..... 59
**REFERÊNCIAS** ..... 67

# 1 INTRODUÇÃO

Os tumores de cabeça e pescoço estão entre as neoplasias mais prevalentes no mundo com mais de meio milhão de novos casos ao ano (1). Entre esses tumores encontram-se os tumores de glândulas salivares, que correspondem a 5% das neoplasias que acometem a região de cabeça e pescoço (2). O carcinoma mucoepidermoide é a mais comum das neoplasias malignas de glândula salivar e seu prognóstico permaneceu inalterado nas últimas décadas (3). Para o carcinoma mucoepidermoide o tratamento de escolha mais aplicado é a cirurgia seguida de radioterapia, pois a quimioterapia não tem mostrado muita eficiência para o tratamento destas neoplasias (4), principalmente quando recidivantes e/ou metastáticas, as quais têm pior prognóstico (4).

Para entendimento dessas características os pesquisadores procuram, nas neoplasias, marcadores biológicos e entre eles estão moléculas envolvidas com o desenvolvimento embrionário. Os genes da família homeobox são importantes nos processos normais de desenvolvimento embrionário, contudo, também estão relacionados aos processos neoplásicos como proliferação, migração e invasão tumoral (5). Além das funções já conhecidas realizadas pelos genes homeobox nos processos normais de desenvolvimento, um crescente número de estudos tem demonstrado que estes genes parecem estar alterados ou expressos de forma desregulada em uma ampla variedade de tumores humanos (5). A correlação dos padrões de expressão dos genes homeobox com a tumorigênese e a progressão do câncer não está ainda totalmente caracterizada (6). Alterações em vários genes homeobox foram demonstradas em diversos tipos de tumores, mas ainda há um debate na literatura sobre se essa é a causa ou o efeito das alterações malignas (7). A expressão inapropriada dos genes homeobox têm sido reportadas em muitas das neoplasias malignas, contribuindo na tumorigênese e processos de metástase. Alterações anormais na expressão dos genes homeobox foram encontradas em uma ampla gama de tumores, incluindo leucemia, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão e câncer de cabeça e pescoço (8) (9) (10), porém com poucas evidências em tumores de glândula salivar. Os genes homeobox também foram associados à transição epitélio-mesenquimal (EMT) e à invasão tumoral, e isso é frequentemente associado à regulação positiva de outros genes homeobox, que em condições normais são expressos em níveis muito baixos

Alterações em níveis de *PROX1* foram encontradas em diversos tipos de neoplasias

humanas: colorretais (8), sarcomas de Kaposi (9), neoplasias hematológicas (10), mama (11), pâncreas (12), carcinoma hepatocelular (13), fígado (14) e de esôfago (15). Por exemplo, como o gene *MEIS1* é um importante fator de transcrição de desenvolvimento, tanto por si próprio quanto como cofator de proteínas para outras proteínas homeobox (TALE ou HOX) (16).

Foi demonstrado que a expressão de *HOXB5* é desregulada em alguns tumores sólidos humanos (17). Assim como o *HOXB5* está superexpresso em tumores de bexiga urinária (18), em tumores ovarianos (19), retinoblastomas (20) e tumores de mama receptores de estrógeno (21).

O gene *HOXB7* mostrou níveis de expressão crescentes quando realizados ensaios de microarray comparando células epiteliais normais, tumores de mama metastáticos primários e lesões metastáticas ósseas (25) (26). Foram estabelecidas relações entre a expressão do *HOXB7* e a presença de metástases regionais, invasão do tecido vascular e alta proliferação das células tumorais provenientes de carcinomas epidermoide de cavidade oral (22).

Um recente estudo demonstrou que a menor expressão do gene *HOXB9* está associada a menor proliferação celular, migração e invasão no carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço (23).

Como exposto, os genes *PROXI, HOHB5, HOXB7, HOXB9, e MEIS1* já foram descritos como alterados em diferentes tumores, porém, nunca foram estudados no carcinoma mucoepidermóide. Além disso, não se sabe se expressão desses genes está relacionada à resposta ao tratamento com cisplatina, quimioterápico amplamente aplicado no tratamento de cânceres de cabeça e pescoço. Entretanto, é de suma importância estudos sobre o efeito de quimioterápicos sobre a expressão dos genes homeobox, a fim de contribuir para uma maior compreensão do desenvolvimento tumoral e também para o desenvolvimento de novas terapias e auxílio diagnóstico. Devido a estes fatos, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

Nos tópicos a seguir será efetuada uma revisão da literatura sobre os tumores de cabeça e pescoço, o carcinoma mucoepidermoide, o que são os genes homeobox e sua participação na carcinogênese.

## 2.1 Tumores de cabeça e pescoço e carcinoma mucoepidermoide

Os tumores de cabeça e pescoço estão entre as dez neoplasias mais prevalentes no mundo, com mais de meio milhão de novos casos ao ano (1).

Os tumores malignos de glândula salivar fazem parte de um grupo heterogêneo de tumores que atualmente envolvem 24 tumores histologicamente distintos (24). Correspondem a cerca de 5% das neoplasias que acometem a região de cabeça e pescoço (2).

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum, correspondendo de 30 a 35% de todas as neoplasias malignas das glândulas salivares (3) e, apresenta maior frequência de metástase linfonodal (25).

Um estudo realizado com 43 pacientes diagnosticados com carcinoma mucoepidermoide mostrou taxa de sobrevivência global e sem doença no período de 5 anos foi de 62,3 e 57,2%, respectivamente. A análise multivariada deste estudo demonstrou que os parâmetros que afetaram significativamente a sobrevida foram a idade do paciente e o método de tratamento selecionado (26).

O carcinoma mucoepidermoide é caracterizado por apresentar histologicamente uma variação de porções de células tumorais mucosas, epiteliais colunares, células intermediárias e, aumento de células ductais secretórias (27). Os carcinomas mucoepidermoides são classificados em alto, médio ou baixo grau (26) (27).

Várias são as alterações genéticas associadas à carcinogênese e metástase do carcinoma

mucoepidermoide (28). Alterações genéticas tais como translocações, aberrações numéricas e estruturais de cromossomos, bem como alterações nas vias de sinalização celulares ocorrem no carcinoma mucoepidermoide (3). A alteração genética mais frequente encontrada no carcinoma mucoepidermoide de glândulas salivares menores é a translocação (11:19) (q21; p13.1), sendo conhecido como o evento primário na tumorigênese celular (29).

Um recente estudo mostra que translocações genéticas ocorrem em uma taxa de 56% dos casos de carcinomas mucoepidermoides de glândula salivar (30). Em um outro estudo em carcinoma mucoepidermoide de pulmão demonstrou-se que um oncogene fusiona-se formando o novo gene quimérico *CRTC1-MAML2*, isso ocorre devido a união entre o exon 1 do gene *CTRC1* no cromossomo 19p13 com os exons 2-5 do gene *MAML2* no cromossomo 11q21(29).

Em carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar menor verificou-se que o gene *MAML2* se divide com ou sem a fusão do gene *CRTC1/3-MAML2* (31).

Para o carcinoma mucoepidermoide o tratamento de escolha mais aplicado é a cirurgia seguida de radioterapia, pois a quimioterapia não tem mostrado muita eficiência para o tratamento destas neoplasias (4). No entanto, o tratamento com quimioterapia tem sido utilizado, principalmente para tumores de glândula salivar avançados, inclusive o carcinoma mucoepidermoide, e um desses quimioterápicos é a cisplatina (4). Portanto, é importante a compreensão das alterações e dos mecanismos moleculares que possam promover e manter o fenótipo resistente das células neoplásicas ao tratamento quimioterápico.

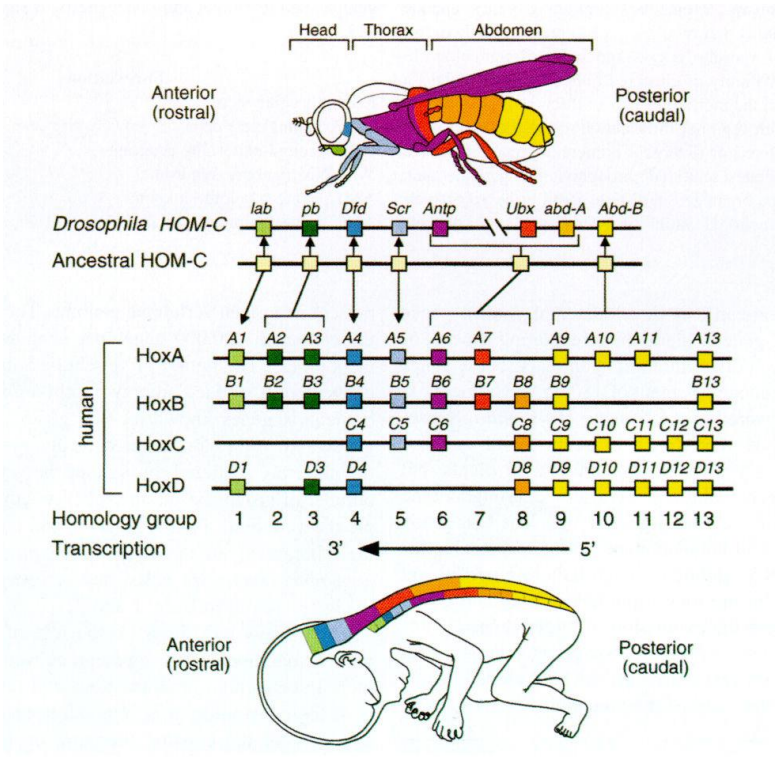
## 2.2 Os genes Homeobox

Os genes homeobox foram identificados pela primeira vez na década de 1980, em Drosophila, e agora é conhecido por estar presente em praticamente todas as espécies eucarióticas (32). Compreendem uma família grande e essencial de reguladores do desenvolvimento que são vitais para todos os aspectos de crescimento e diferenciação celular (7). Codificam um conjunto de fatores de transcrição envolvidos numa vasta gama de processos biológicos, incluindo a especificação e padronização de destino das células embrionárias e seu desenvolvimento (5).

Membros de seis famílias de homeoproteínas estão expressas em inúmeros tecidos durante a embriogênese de vertebrados, e são importantes reguladores dos processos envolvidos na proliferação e desenvolvimento celular (7). Um recente estudo mostrou que esse conjunto de genes é responsável pela codificação de 241 proteínas em humanos (2). Em mamíferos, esses genes atuam controlando diversas funções, e mutações podem causar graves defeitos de desenvolvimento**,** tais como a perda de estruturas específicas, controle autônomo na diferenciação celular, alterações no controle do ciclo celular e até mesmo alterações nas interações teciduais (33).

Os genes *HOX* pertencem à grande família dos homeobox e, portanto, apresentam como característica a regulação do desenvolvimento embrionário, diferenciação e especificação tecidual (7). Os genes *HOX* são divididos em dois grupos principais, genes de classe I e classe II (36). Em mamíferos, a família de genes *HOX* de Classe I contém 39 membros, com um homeodomínio altamente conservado de 61-aminoácidos organizados em quatro conjuntos parálogos (A, B, C e D), e, localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2 respectivamente (34). Cada conjunto contém de 9 a 11 genes arranjados em 13 e sua posição cromossômica é específica em relação ao conjunto de genes (2). Esses genes têm suas estruturas e funções altamente conservadas durante a evolução dos vertebrados (36). No adulto desempenham diversas funções como o controle e regulação de processos fisiológicos, produção e secreção de diversos hormônios (35). São responsáveis pela codificação dos fatores de transcrição com importantes papéis no desenvolvimento de várias estruturas incluindo, o eixo principal do corpo e os eixos apendiculares (4), e, estão presentes em todos os principais sistemas, além da embriogênese (39) (40) (41). A conservação evolutiva de várias características, incluindo regiões específicas da sequência do gene homeobox, a organização cromossômica de 3’ a 5’ e a expressão específica sugerem que esses genes são básicos para o desenvolvimento embrionário e fetal (38). Figura ilustrativa da organização genômica e distribuição dos genes *HOM* na Drosófila e dos grupos *HOX* em humanos (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Organização genômica e distribuição dos genes *HOM* na Drosófila, dos grupos *HOX* em humanos e de um hipotético complexo ancestral. Os quatro complexos *HOX* em humanos são mostrados com seus grupos homólogos e a direção da transcrição. Cada gene é representado por um quadrado de cor diferente (retirado de MARK et al., 1997). HOX, homeobox




Durante a embriogênese, os genes homeobox mostram um padrão de expressão específico para cada região do corpo (39). Estudos em animais demonstraram o envolvimento crucial dos genes homeobox no desenvolvimento de néfrons e outras estruturas renais em diversos momentos do desenvolvimento renal (36). Além disso, na ausência dos homeodomínios *(Six1$^{-/-}$)* camundongos, exibiram hipoplasia ou o completo não desenvolvimento do timo, malformações craniofaciais e defeitos na neurogênese (39).

Pesquisas mostram que os homeobox estão envolvidos também no controle espacial e temporal da formação dos tecidos orais e maxilofaciais (39). A embriogênese de glândulas salivares, assim como o correto funcionamento secretório dos ductos glandulares são controlados por genes homeobox (43). Estudos em glândula salivar de Drosophila sugerem que as vias genéticas que determinam o destino das células e, identificaram várias moléculas

efetoras estão localizadas a jusante dos reguladores *HOX*/homeóticos que medeiam as mudanças específicas na estrutura e função celular (40). Durante a maturação da glândula salivar submandibular de camundongos, desde a embriogênese até o desenvolvimento pós-natal, a expressão do gene homeobox *Six1* é fundamentalmente importante (44). Estudos demonstram que o fator de transcrição *Hmx3* é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento pós-natal das glândulas sublingual, submandibular e parótida em camundongos (41).

Além das funções já conhecidas realizadas pelos genes homeobox nos processos normais de desenvolvimento, um crescente número de estudos tem demonstrado que estes genes parecem estar alterados ou expressos de forma desregulada em uma ampla variedade de tumores humanos (38). A correlação dos padrões de expressão dos genes homeobox com a tumorigênese e a progressão do câncer não está ainda totalmente caracterizada (6). Alterações em vários genes homeobox foram demonstradas em diversos tipos de tumores, mas ainda há debate na literatura sobre se essa é a causa ou o efeito das alterações malignas (7). Uma série de razões foram sugeridas, incluindo a presença ou a ausência de alguns cofatores, além de variações nas vias de sinalização em diferentes tipos de tecidos (42). No entanto, o paradigma geral é que a regulação negativa ou positiva dos homeobox levam à ativação de vias de desenvolvimento embrionário em órgãos já maduros, interrompendo assim, as formas normais de diferenciação ou de crescimento celular que, por sua vez, podem subverter o comportamento fisiológico normal das células levando à neoplasia (43). Alterações anormais na expressão dos genes homeobox foram encontradas em uma ampla gama de tumores, incluindo leucemia, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão e câncer de cabeça e pescoço (8) (9) (10). Estudos imunológicos identificaram alterações regionais e específicas celulares onde se localiza a proteína Hoxb-5 ao longo dos períodos de desenvolvimento do pulmão nas regiões pseudo-glandulares, canaliculares e terminais (45).

## 2.3 Os genes homeobox e o câncer

Um corpo substancial de evidências científicas indica que a expressão de muitos genes que são críticos para o desenvolvimento normal do embrião, quando aberrantes, contribuem para a carcinogênese (46). É amplamente aceito que muitas das vias moleculares subjacentes à carcinogênese representam aberrações dos processos normais que controlam a embriogênese

(7). Há muitos exemplos em que a expressão anômala de genes que regulam o crescimento e o desenvolvimento têm sido implicados na carcinogênese. Entre os principais exemplos estão os genes homeobox, que codificam proteínas reguladoras da transcrição de homeoproteínas (7).

Os genes homeobox codificam homeoproteínas que são componentes-chave das principais vias regulatórias e foram estudadas detalhadamente na última década por seus papéis nos mecanismos subjacentes tanto à organogênese quanto à oncogênese.

A importância dos genes homeobox na biologia do câncer está estreitamente ligada à sua capacidade de regular mecanismos importantes, como angiogênese, sobrevivência celular, apoptose, proliferação celular, invasão e metástase (7).

Homeoproteínas são pequenas proteínas que atuam como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário normal e são críticas para a adequada formação do eixo anterior-posterior em embriões (47).

As homeoproteínas são amplamente utilizadas durante o desenvolvimento normal e são freqüentemente expressas aberrantemente no desenvolvimento de tumores (7). Contudo, foi demonstrado que os genes homeobox estão envolvidos não somente no desenvolvimento de diversos tipos de tumores, mas também, na repressão no desenvolvimento de outros. Evidenciou-se que os produtos protéicos dos genes homeobox atuam como fatores transcricionais que promovem a carcinogênese, porque são regulados positivamente nas células cancerígenas, e desregulam várias vias de sinalização através de seus efeitos nos alvos a jusante dessas vias. (46). Porém, pesquisadores mostraram que os genes homeobox atuam não apenas como ativadores transcricionais nos cânceres, mas também como repressores transcricionais (46).

A expressão inapropriada dos genes homeobox têm sido reportada em muitas das neoplasias malignas, contribuindo da tumorigênese aos processos de metástases, como exemplo, o gene *HOXB7* vem sendo avaliado como um possível marcador para o diagnóstico de carcinoma epidermoide quando superexpresso (25), com poucas estudos com tumores de glândula saloivar.

Os genes homeobox também foram associados à transição epitélio-mesenquimal (EMT) e à invasão tumoral, e isso é frequentemente associado à regulação positiva de outros genes homeobox, que em condições normais são expressos em níveis muito baixos.

Também, padrões significativos de expressão diferencial entre tecidos mamários não malignos e malignos foram demonstradas. Em particular, os genes HOX que codificam HOXB5, HOXB7, HOXB9 entre outros foram expressos de forma aberrante no câncer de mama (6).

### 2.3.1 *HOXB5, HOXB7, HOXB9*

O *HOXB5* está localizado próximo ao centro do cluster *HOXB* e está envolvido no desenvolvimento normal do pulmão e do intestino em camundongos e humanos entre outros tecidos (45) (50) (48). Também se demonstrou que a expressão de *HOXB5* é desregulada em alguns tumores sólidos humanos e é um fator importante em várias doenças humanas, incluindo câncer. A superexpressão de *HOXB5* nos tumores de esófago, bexiga, ovário e oral e a sua regulação negativa nos tumores renais foram já relatadas, mas os seus papéis funcionais e os mecanismos subjacentes permanecem largamente desconhecidos (17) (49).

A expressão anormal de *HOXB5* também foi observada em diversos tumores. Foi demonstrado que o *HOXB5* está superexpresso em tumores de bexiga urinária (21),em tumores ovarianos (19), retinoblastomas (20), e, tumores de mama receptores de estrógeno positivos (21). Já no carcinoma gástrico humano o *HOXB5* induz a invasão e a migração através da regulação positiva da transcrição da β-catenina (50).

Estudos com cultura de células também têm demonstrado que a superexpressão do gene *HOXB7* pode resultar em um fenótipo com um perfil mais metastático, como perda de adesão celular e diversas outras alterações morfológicas (51). O gene *HOXB7* mostrou níveis de expressão crescentes quando realizados ensaios de microarray comparando células epiteliais normais, tumores de mama metastáticos primários e lesões metastáticas ósseas (54). A superexpressão de HOXB7 contribui para a proliferação e tumorigênese em células colorretais *in vivo* e *in vitro* (52). Os genes *HOXB7* também regulam direta ou indiretamente as vias do TGFβ, que está envolvido com os processos de proliferação e invasão tumoral em diversos tipos de carcinomas (53). Foram estabelecidas relações entre a expressão do *HOXB7* e a presença de metástases regionais, invasão do tecido vascular e alta proliferação das células tumorais provenientes de carcinomas epidermoide de cavidade oral (22).

O *HOXB9* é expresso no início da embriogênese e sua superexpressão já foi descrita no desenvolvimento de diversos tipos de tumores(54). Um recente estudo demonstrou a superexpressão do gene *HOXB9* em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço e, que a menor expressão do gene *HOXB9* está associada a menor proliferação celular, migração e invasão (26).

A superexpressão do *HOXB9* tem sido relacionada a um prognóstico não favorável para pacientes com adenocarcinoma de pulmão (55). Similarmente, este mesmo gene apresentava aumento de expressão em neoplasias malignas de glândulas mamárias, sendo também responsável pelo processo de metástase (24).

Em tecidos de glândula salivar normais as proteínas HOXB7 e HOXB9 aparecem expressas, porém, de forma mais intensa em tumores malignos e benignos derivados dessas estruturas (56). Há evidências de uma correlação positiva entre a expressão das proteínas HOXB7 e HOXB9 e o marcador neo angiogênico CD105, que estão intimamente relacionados com a proliferação celular no carcinoma adenoide cístico (59).

Diversos autores têm demonstrado o envolvimento dos genes Homeobox em outras neoplasias como gliomas (24), linfomas (57), de pulmões (55), de tireóide (28), câncer gástrico (20), e de cabeça e pescoço (23).

Apesar dos genes da família homeobox já serem utilizados como fatores para determinação do prognóstico de inúmeras neoplasias humanas, a sua participação em relação às neoplasias de glândulas salivares e na resposta aos tratamentos com quimioterápicos necessitam melhor esclarecimento devida escassez de trabalhos que tratam do assunto na literatura.

### 2.3.2 *MEIS1*

O gene do fator de transcrição do sítio homólogo de integração viral mieloide ecotrópico 1 (MEIS1, Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1 Homolog) foi originalmente identificado como um sítio de integração viral comum envolvido na leucemia mieloide (58). Membro da família de proteínas com homeodomínio TALE (extensão de alça com três aminoácidos), é um importante fator de transcrição durante o desenvolvimento embrionário, tanto por si próprio

quanto como cofator de proteínas para outras proteínas homeobox (TALE ou HOX) (16).

Dentro do homeodomínio, o *MEIS1* está mais intimamente relacionado à família de proteínas do homeodomínio *PBX*. O *MEIS1* funciona como um cofator de ligação ao DNA das proteínas *HOX* através da interação com *PBX* (Pre-B-Cell Leukemia Homeobox), é membro de outra subfamília de fatores de transcrição do homeodomínio TALE (59). O membro principal desta família, *PBX1*, foi identificado como o parceiro de fusão de TCF3 (E2A) em leucemias humanas de células Pré B apresentando a translocação t (1; 19) (q23; p13.3) (60) Além disso, outros membros da família TALE, incluindo os outros genes *MEIS (MEIS2 e 3*) e (*PBX*) (PBX1-4), são também importantes no desenvolvimento normal (58).

Em contraste com o papel bem estabelecido do *MEIS1* no desenvolvimento da leucemia, a sua função na hematopoese pós-natal, especialmente nas células tronco hematopoiéticas, bem como células progenitoras hematopoiéticas permanece incerta (61). A deleção homozigótica direcionada de *Meis1* em camundongos resulta na morte do embrião com 14,5 dias, ou então resulta em severas deformidades hematopoiéticas e vasculares (65) (63). Na ausência do gene *Meis1*, o desenvolvimento hepático em camundongos está comprometido afetando, tanto o potencial de formação de colônias das células tronco hepáticas, bem como as células progenitoras hepáticas (61).

Os genes *MEIS*, *PBX* e *HOX* regulam a expressão de uma complexa rede de genes alvo, como complexos proteína-DNA, nos quais as proteínas MEIS, PBX e HOX exibem propriedades específicas de ligação ao DNA (64). O *MEIS1* é um ativador para os membros da família HOX, como *HOXA9* e *HOXA7* (65). Este tipo de correlação é frequente, uma vez que o *MEIS1* é um cofator transcricional. O gene MEIS1 tem um papel distinto na auto renovação e manutenção do estado “tronco” (Stemness, do inglês) de diferentes tipos de células tronco, incluindo células neuronais e hematopoiéticas (66). Sua expressão tem papel na auto renovação, por exemplo, das células-tronco neurais no desenvolvimento do epitélio olfatório (67). Contrariamente, foi demonstrado que a deleção do gene *MEIS1* em miocárdio adultos resultou na indução da proliferação de miocárdio, o que indica o possível surgimento de um novo método para o tratamento de lesões do musculo cardíaco tal como o infarto do miocárdio (68). Como as células-tronco tumorais compartilham propriedades, como a auto renovação de células-tronco normais, pode-se interpretar que fatores detransição, como o *MEIS1*, possuem papeis importantes no desenvolvimento, progressão e a manutenção dos tumores (69).

Como já exposto a expressão desregulada desses genes podem causar distúrbios graves

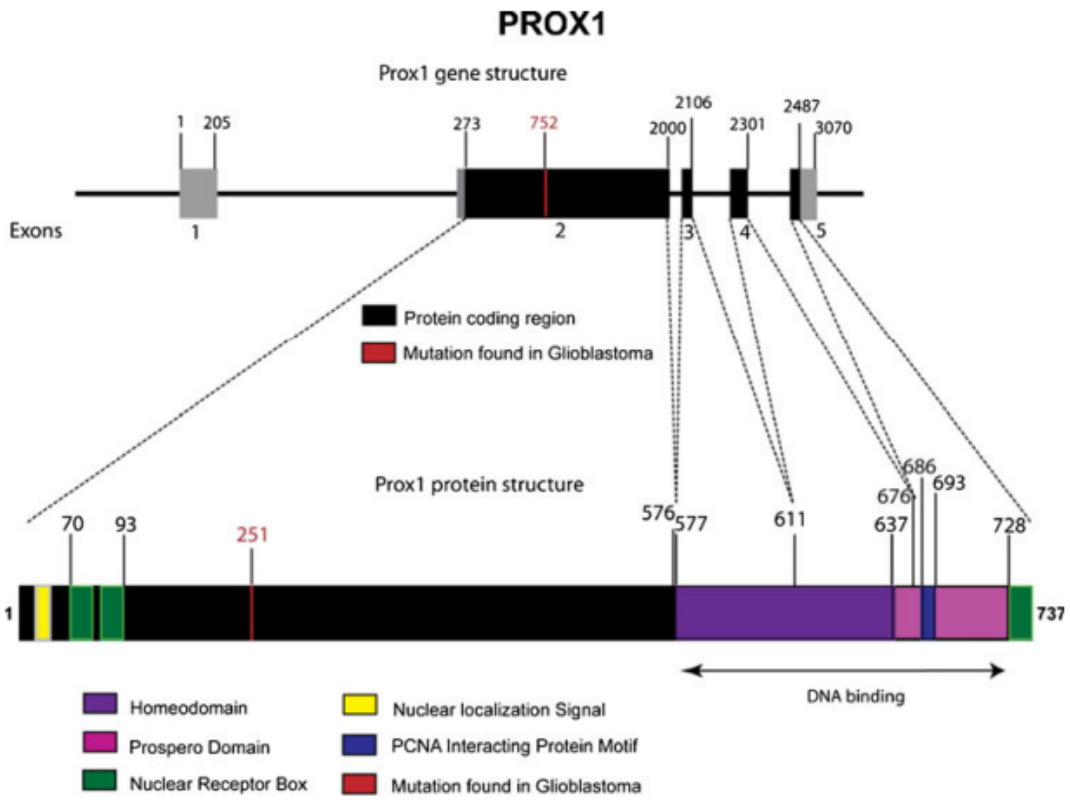
no desenvolvimento embrionário e o câncer. O gene *MEIS1* encontra-se amplificado e superexpresso em tumores de ovário em comparação com o epitélio de superfície ovariano normal e adenocarcinomas de pulmão, cólon e ovário primários (70) (74). Observou-se ainda que o gene *MEIS1* atua como um oncogene super estimulador no tumor ósseo maligno sarcoma de Ewing (71).

Até o presente momento não há informações acerca de uma possível associação do gene *MEIS1* com outros genes da família *HOX* em carcinoma mucoepidermóide.

### 2.3.3 *PROX1*

O fator de transcrição de mamíferos *PROX1*, cujo homólogo em Drosophila é o próspero, pertence à família dos fatores de transcrição homeobox (72). O gene humano *PROX1* está localizado no cromossomo 1q32.2 - q32.3 e é composto por cinco exons e quatro introns. Com 2.924 pares de bases de DNA. A proteína codificada pelo *PROX1* contém 737 aminoácidos e possui massa molecular de 82,3 kDa (73) (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Diagrama esquemático e estrutura de domínio de proteína do *PROX1*. O código de cores é usado para destacar a região codificadora do gene (preto), das partes não codificadoras (cinza). Diferentes partes funcionais da proteína são indicadas, incluindo o homeodomínio, o domínio próspero e as caixas receptoras nucleares. A ilustração também indica qual região da proteína é codificada por cada um dos cinco éxons individuais. A numeração de nucleotídeos e aminoácidos refere-se ao *PROX1* humano (AL606537, GI: 17154354 PROX1-202 ENST00000435016 (www.ensemble.org)




O *PROX1* distingue-se de outros membros da família homeobox por seu homeodomínio atípico no terminal C, que não compartilha qualquer semelhança direta de seqüência com outros homeodomínios. O homeodomínio *PROX1*, no entanto, cria a característica estrutura de dobra hélice-alça-hélice (74). Desta forma, atua em conjunto com o domínio prospero para formar uma única unidade funcional de ligação de DNA (75).

É uma proteína fundamental para o desenvolvimento de órgãos durante a embriogênese (76). Foi demonstrado que camundongos knockout *PROX1* morrem antes do nascimento devido a múltiplos defeitos de desenvolvimento (77).

O *PROX1* atua ativamente durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Vários estudos comprovaram um papel regulador do *PROX1* na neurogênese dos mamíferos que, ocorre desde a formação das células progenitoras, sua diferenciação, até aos estágios iniciais da neurogênese (78). O *PROX1* pode, também, ser detectado nos estágios iniciais de desenvolvimento do fígado e do pâncreas (79).

Nos vertebrados, a membrana basal ao redor do epitélio hepático degrada durante a formação do fígado e após a formação do broto hepático. Os hepatócitos do epitélio hepático migram para assumir suas posições nos lobos hepáticos. Esta migração de hepatócitos é regulada pelo gene *PROX1* (80).

Em embriões de camundongos sem o *PROX1*, o fígado é 70% menor do que em embriões do tipo selvagem, devido à ausência de hepatócitos nos lóbulos do fígado (78). Já o sistema linfático se origina da mesma fonte que o sistema vascular sanguíneo, mas depois se separa durante o desenvolvimento embrionário. O *PROX1* faz com que um grupo de células endoteliais, após o surgimento da veia cardinal, forme o sistema linfático (81).

Durante o desenvolvimento do coração, o *PROX1* pode ser detectado em todo o miocárdio dos átrios. Nocaute específico cardíaco de *PROX1* leva a anormalidades cardíacas graves, incluindo redução de 30% no tamanho e interrupção do fluxo sanguíneo, consequentemente, camundongos knockout apresentam edema cardíaco (82).

O *PROX1* além de ser um regulador transcricional envolvido na organogênese, também está envolvido como em uma variedade de tipos de tumores (72).

Alterações em níveis de *PROX1* foram encontradas em diversos tipos de neoplasias humanas: colorretais (8), sarcomas de Kaposi (9), neoplasias hematológicas (10), mama (11), pâncreas (12), carcinoma hepatocelular (13), fígado (14) e de esôfago (15). Níveis alterados de proteína *PROX1* foram detectados em células tumorais em comparação com homólogos de células normais (12). No câncer gástrico, o PROX1 pode promover a progressão tumoral induzindo proliferação de células neoplásicas e linfangiogênese (83).

Apesar de alterações na expressão de *PROX1* serem relatadas em várias formas de neoplasias, ainda não é esclarecido o papel que o *PROX1*, que podendo possuir propriedades supressoras ou oncogênicas (72). O gene *PROX1* tem sido citado como um gene supressor tumoral ou participante do processo de oncogênese em diversos tipos de tumores (84). Em humanos, o gene *PROX1* atua diferentemente em vários tecidos, ativando ou reprimindo a transcrição, atuando na migração e proliferação celular de tumores (72). Porém também já foi demonstrado que a superexpressão do gene *PROX1* está relacionada à um comportamento mais agressivo em diversos tumores endoteliais (85).

Em contrapartida, o PROX1 se mostrou como um marcador significativo de melhor prognóstico em pacientes acometidos com tumores malignos intestinais (76). Já em carcinoma epidermoide oral, a superexpressão do PROX1 está associada a uma redução da proliferação celular sugerindo que uma das funções do *PROX1* é a de gene supressor da carcinogênese oral (84). Contrariamente, em alguns tumores de cabeça e pescoço o *PROX1* está relacionado com a indução da linfoangiogênese em linfonodos sentinelas no estabelecimento de metástases regionais (86). Estes fatos abrem precedentes para melhor estudar o comportamento da expressão desse gene nos tumores de cabeça e pescoço, incluindo o carcinoma mucoepidermoide.

## 2.4 Cisplatina

A cisplatina é um dos quimioterápicos mais utilizados em carcinoma de cabeça e pescoço. Este fármaco é um agente que atua no DNA da célula através de diversos mecanismos causando prejuízos à sua estrutura, desta forma, induzindo a apoptose (87). No entanto, as células cancerosas podem desenvolver resistência aos fármacos quimioterápicos, por exemplo, a inibição do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) aumenta a sensibilidade das linhagens celulares à cisplatina em carcinoma epidermóide, sugerindo que a elevada atividade do EGFR contribui para a resistência adquirida à cisplatina (88). Uma população conhecida por apresentar tal resistência à cisplatina são as células-tronco tumorais (89).

Em carcinomas mucoepidermoides tais células já foram identificadas, inclusive nas

linhagens celulares utilizadas para a elaboração desta dissertação. Estas células tronco tumorais são caracterizadas por um potencial tumorigênico aumentado, apresentam capacidade de autorrenovação e de se diferenciar em células que compõem a massa tumoral (3) (90). A resistência que essas células apresentam à cisplatina parece ser dose-dependente (91), desta forma, sendo necessário mais estudos sobre a forma de atuação deste quimioterápico no carcinoma mucoepidermóide e na população deste tumor.

Adicionalmente, pouco se sabe a respeito do efeito da cisplatina sobre os genes homeobox. Em um estudo com células de câncer de cólon, foi observado que o aumento da expressão de *ERβ* promove aumento da resistência à apoptose celular em células tratadas com cisplatina, através da inibição de *PROX1* (92). *MEIS1* também é outra proteína homeobox relacionada à resistência à cisplatina em células de câncer de ovário (93). Isto foi comprovado quando três genes TALE, *MEIS1, MEIS2 e PBX3* foram regulados negativamente em três sub-linhagens resistentes à cisplatina derivadas de linhagens de câncer de ovário (93).

Não existem evidências sobre o efeito da cisplatina sobre os genes HOXB5, HOXB7 e HOXB9, assim como o efeito da cisplatina sobre estas vias de sinalização em carcinoma mucoepidrmoide.

Assim, este trabalho se propõe a analisar *in vitro* a expressão de genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermoide após tratamento com cisplatina.

# 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes homeobox em linhagens celulares de carcinoma mucoepidermoide tratadas com cisplatina.

## 3.1 Objetivos específicos

Tratar com cisplatina as células derivadas de carcinoma mucoepidermoide (linhagens UM-HMC-1, UM-HMC-2 e UM-HMC-3A) e verificar:

a) A expressão dos genes homeobox (*PROX1, MEIS1, HOXB5, HOXB7 e HOXB9*) nas células derivadas de carcinoma mucoepidermoide, comparando o perfil de expressão dos genes homeobox nas células tumorais sem e com o tratamento com cisplatina, através da técnica de RT-qPCR.
b) O efeito da cisplatina sobre a capacidade de formação de esferas em ensaio de cultivo celular
c) O efeito da cisplatina sobre a migração das células de carcinoma mucoepidermoide através de ensaio de ferida

# 4 METODOLOGIA

Tendo em vista a legislação vigente, este projeto foi devidamente submetido à apreciação do CEP-FOUSP e, aprovado para a execução das metodologias propostas sob o registro CAAE:71697817.0.0000.0075. (Pareceres substanciados do CEP em anexos A e B).

## 4.1 Cultivo celular

As linhagens celulares foram inicialmente obtidas a partir de carcinomas mucoepidermóides salivares cirurgicamente ressecados entre março de 2010 e agosto de 2012.. As linhagens UM-HMC1 (do inglês "University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma 1) e 2 foram derivadas de tumores primários, e a linhagem UM-HMC3A derivada de recorrência local de carcinoma mucoepidermoide quatro anos após a remoção cirúrgica do tumor primário (3). Essas linhagens foram geradas e caracterizadas no Laboratório de Angiogênese (Faculdade de Odontologia, Universidade de Michigan, Ann Arbor, MI, EUA), e, gentilmente doadas a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP pelo professor doutor Jacques E. Nör.

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares de carcinoma mucoepidermoide UM-HMC-1, UM-HMC- 2 e UM-HMC-3A (3). As linhagens foram cultivadas de acordo com as recomendações em meio de cultura DEMEM (Gibco) suplementado com 1% l-glutamina (GlutaMAX™, Gibco), 5% antibiótico/antimicótico (#15240112, Gibco), 10% Soro Fetal Bovino (FBS, Gibco), 400ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 20ng/ml de fator de crescimento epitelial humano (EGF) (#E9644, Sigma-Aldrich), 5ug/ml de insulina recombinante humana (#I9278, Sigma-Aldrich).

Todas as linhagens foram mantidas a 37° C em incubadora umidificada à 5% de $CO_2$ e ar atmosférico de 95%. O meio de cultivo foi trocado a cada 2-3 dias dependendo do metabolismo celular e as passagens foram efetuadas na proporção (1:3) utilizando tripsina (TrypLE™ Express, Gibco). Alíquotas de todas as linhagens foram congeladas e descongeladas quando houve a necessidade.

## 4.2 Tratamento com cisplatina

Para o tratamento com a cisplatina, primeiramente, as linhagens celulares UM-HMC-1, UM-HMC-2 e UM-HMC-3A foram cultivadas até que atingissem uma confluência de 70 a 80% em frascos plásticos de 25 ou 75 $cm^2$ (NUNC, Naperville, IL, EUA) em meio de cultivo DEMEM (Gibco) suplementado com 1% l-glutamina (GlutaMAX™, Gibco), 5% antibiótico/antimicótico (#15240112, Gibco), 10% Soro Fetal Bovino (FBS, Gibco), 400ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 20ng/ml de fator de crescimento epitelial humano (EGF) (#E9644, Sigma-Aldrich), 5µg/ml de insulina recombinante humana (#I9278, Sigma-Aldrich). Após atingirem a confluência desejada, as células foram tripsinizadas e centrifugadas com o meio de cultura. Seguidamente, as células foram replaqueadas em frascos plásticos na densidade de $10^6$ células por frasco. Após 24 horas, período necessário para a aderência das células à placa, o meio de cultivo foi substituído, porém, desta vez, adicionados 8,4µL de cisplatina por 100ml de solução de meio de cultivo, correspondente a aproximadamente 2,8µM.

As células foram expostas ao meio contendo cisplatina por 24h, após este período lavou-se as células por 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e preparadas para a extração de RNA ou plaqueadas para os ensaios de ferida e formação de esferas. Como controle, procedeu-se o mesmo processo, com a mesma densidade celular, porém cultivadas em meio de cultivo sem a cisplatina.

## 4.3 Isolamento do RNA

O RNA das populações celulares isoladas tratadas e não tratadas com cisplatina foi extraído pelo uso da técnica de isoticianato de guanidina. Desta maneira, as células em cultura foram lavadas e incubadas com 500µl TRIzol (Invitrogen) por 5 minutos. Após a lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,3 ml de clorofórmio/ml. Após a centrifugação a 12.000 xg durante 15 minutos a 4º C, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis e foram adicionados 0,75 ml de álcool isopropílico por mililitro de solução desnaturante. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 xg por 10 minutos a 4º C.

Neste momento foi possível observar a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo. A solução sobrenadante foi descartada e foi adicionado 0,65 ml de álcool 75% gelado.

Após isso, as amostras foram centrifugadas a 6.000 xg por 5 minutos, o álcool foi descartado cuidadosamente para não mobilizar o pellet precipitado.do fundo do microtubo. Os tubos foram vertidos por 8 min em temperatura ambiente para a evaporação do álcool. Seguidamente, o RNA foi ressuspendido em água livre de DNAse e RNAse. O RNA foi armazenado a -80ºC até o momento de sua utilização. A concentração de RNA foi determinada pelo espectofotômetro (Nanodrop) com comprimento de onda de 260 e 280nm, um µg de RNA foi misturada com 5x tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol), aquecidos durante 10 minutos a 70ºC e separados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 1h a 60V para análise de sua integridade. A razão da absorbância 260/280 ficou acima de 1.8.

## 4.4 Síntese de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da concentração de RNA aferida pelo espectofotômetro Nanodrop nas unidades de ng/ µl. Para o calculo da concentração necessária de RNA para a padronização da síntese de cDNA em µg/ µl foi estabelecida a função f(x)=1000/x, onde x é o valor da concentração de RNA respectivo de cada amostra em nanogramas.

O cDNA utilizado nas reações de RT – qPCR foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando-se a enzima Multiscribe transcriptase reversa e oligonicleotídeos randômicos (High Capacity cDNA Archive kit, Applied Biosytems, Foster City-CA) num volume final de 21µl, partindo-se de 1µg de RNA total, previamente tratada com DNase I (DNase I Amplification Grade, Invitrogen), por meio de uma reação de transcrição reversa A mistura com todos os reagentes necessários para a reação foi preparada em fluxo laminar e os tubos serão incubados em termociclador (Mastercicler, Eppendorf).

## 4.5 PCR quantitativo em tempo Real (qPCR)

Para análise dos níveis de expressão dos genes de interesse foram efetuadas as reações de RT - qPCR. Para tanto, foi utilizado termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied BiosystemsCarlsbad, CA, USA), fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Byosistems), iniciadores específicos para os genes *PROXI*, *MEIS1*, *HOXB5*, *HOXB7* e *HOXB9* e para o gene constitutivo *HPRT*, utilizado a temperatura de meltinga a 60ºC para todos os iniciadores, seguindo especificações do fabricante. Os iniciadores foram obtidos da literatura ou desenhados utilizando a sequência dos genes obtida do GenBank, a ferramenta BLAST nucleotídeo e Primer-BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), e o software PrimersList (http://primerdigital.com). A sequência dos primers utilizados encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizadas para os RT-qPRCs.

| Gene | Forward 5' – 3' | Reverse 5' – 3' | # acesso |
|---|---|---|---|
| ***PROX1*** | CTCCGTGGAACTCAGCGC | GCCGGCTTAAGAGGGCTG | NM001270616.1 |
| ***MEIS1*** | TCTGCACTCGCATCAGTACC | ATTGACAGAGGAGCCCATGC | NM_002398.3 |
| ***HOXB5*** | CCAATTTCACCGAAATAGAGC | CGGTCATATCATGGCTGATG | NM_002147.3 |
| ***HOXB7*** | GAAAGACAGATCAAGATTTGGTT | CTGGGCTTCTCTTCCTCTCCCTTTCTCATG | NM_004502.3 |
| ***HOXB9*** | CTACGGTCCCTGGTGAGGTA | TAATCAAAGACCCGGCTACG | NM_024017.5 |
| ***PRT*** | CCACCACCCTGTTGCTGTA | TCCCCTGTTGA CTGGTCAT | NM_000194.3 |

Todas as reações realizadas num volume final de 10 µL em tubos óticos com os seguintes reagentes: iniciadores *foward* e *reverse* (concentração final de 400nM) para os genes *PROXI*, *MEIS1*, *HOXB5*, *HOXB7* e *HOXB9* e *HPRT* (concentração final de 10nM), 5 µl Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA (1 µL) e 3,2 µl água. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95ºC por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95ºC por 10 seg e 60ºC por 1 min. 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.Como controle negativo da

reação foi realizada reação utilizando-se todos os componentes da solução acima citada com a exceção da amostra para avaliação de sua possível contaminação.

Para a quantificação relativa dos genes estudados no presente trabalho, todas as triplicatas experimentais foram amplificadas em duplicata e a quantidade normalizada do gene-alvo foi determinada através da curva-padrão, obtida a partir de 4 diluições seriadas de cDNA das linhagens utilizadas, para obtenção dos valores de expressão em ΔCt. Para fins de quantificação, os resultados finais obtidos encontram-se calculados por ΔΔCt a partir da expressão relativa ao gene constitutivo HPRT.

### 4.6 Ensaio de formação de esferas

Para o ensaio de formação de esferas tumorais, primeiramente, as células de cada linhagem UM-HMC-1, UM-HMC- 2 e UM-HMC-3A, foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de $10^5$células por poço e tratadas com cisplatina por 24h. Após este período as células foram desaderidas com tripsina (cat #12604021, Gibco), a enzima foi inativada com meio de cultivo e as células plaqueadas na densidade de 1000 células, por poço, em placas de baixa aderência de 24 poços (Costar, 24 well cell culture cluster, cat# NY-14831, Corning). Após 14 dias, as esferas foram visualizadas utilizando-se um microscópio invertido, sendo as imagens também capturadas (Nikon, modelo Ti-S) após a contagem.

### 4.7 Ensaio migração celular (Ferida)

As linhagens celulares foram plaqueadas, em triplicata, na densidade de $5x10^5$ células em placas de cultivo (6 poços) até atingirem a confluência. Após a confluência, uma linha reta foi traçada de ponta a ponta, no centro de cada poço da placa, utilizando uma ponteira de 100ul estéril, formando uma fenda (área de ferida). Os poços foram então lavados com PBS1x, fotografados 5 campos por poço e mantido em meio de cultivo convencional, para o grupo controle, ou em meio de cultivo contendo a cisplatina na concentração de 8,4µl/ml. O crescimento das células foi monitorado e fotografado (Nikon, modelo Ti-S), 24h após para

analisar a área coberta por células migratórias para o centro da ferida. A área da “ferida” foi quantificada usando o software ImageJ.

## 4.8 Análise estatística

Para a análise estatística, para todos os resultados foi efetuado o teste Shapiro-Wilk para verificar a aderência das amostras, considerando $\alpha=0,05$.

Para a comparação da expressão de genes analisados foi utilizado o teste de variância One Way ANOVA e posteriormente Tukey. Para os resultados de esfera e ferida foi utilizado o teste t. A significância estatística foi determinada em $\alpha<0,05$.

Todas as análises foram efetuadas através do software GraphPad (Microsoft, EUA).

# 5 RESULTADOS

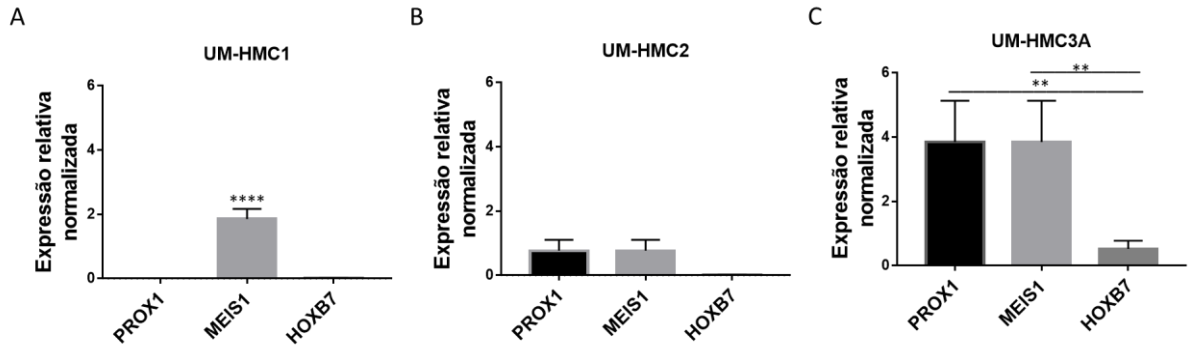
## 5.1 Expressão de genes homeobox em linhagens de carcinoma mucoepidermoide

Para verificar o padrão de expressão de genes homeobox nas diferentes linhagens de carcinoma mucoepidermoide analisadas foi efetuado o ensaio de RT-qPCR para os genes *PROX1*, *MEIS1*, *HOXB5*, *HOXB7* e *HOXB9*.

Ao analisarmos cada linhagem foi possível observar que o padrão de expressão de *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7* apresenta uma pequena variabilidade entre as linhagens.

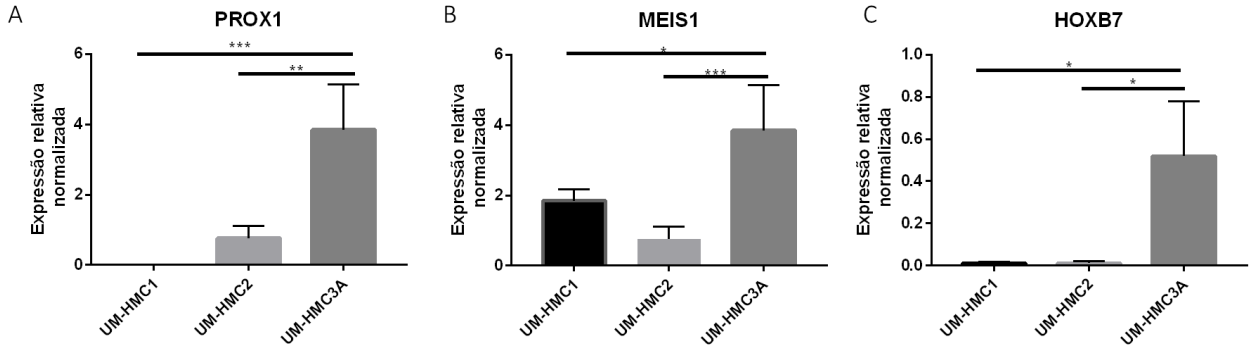
A linhagem UM-HMC1 (Figura 5.1 A) expressa apenas o *MEIS1* e discreta expressão de HOXB7, enquanto que as linhagens UM-HMC2 (Figura 5.1 B) e UM-HMC3A (Figura 5.1 C) expressam *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7*, sendo a expressão de *HOXB7* menor que a expressão dos demais genes, de forma significativa apenas na linhagem UM-HMC3A.

Figura 5.1 - Padrão de expressão gênica de *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7* nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar. A, linhagem UM-HMC1. B, linhagem UM-HMC2. C, linhagem UM-HMC3A. Expressão relativa (Fold Change). ($^{**}$p<0,002; $^{****}$p<0.0001, por ANOVA)



Ao compararmos a expressão de cada gene entre as diferentes linhagens, foi observado que a linhagem UM-HMC3A apresenta uma maior expressão dos genes *PROX1* (Figura 5.2A), *MEIS1* (Figura 5.2B) e *HOXB7* (Figura 5.2C) que as linhagens UM-HMC1 e UM-HMC2. Sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Figura 5.2 - Expressão dos genes homeobox PROX1, MEIS1 e HOXB7 nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide não tratadas com cisplatina (Controle). A, B e C. Expressão relativa (Fold Change). A, PROX1. B, MEIS1. C, HOXB7. ($^{*}p<0,05$; $^{**}p<0,001$; $^{***}p<0,0003$)




Não foi detectada a expressão dos genes *HOXB5* e *HOXB9* nas linhagens analisadas.

## 5.2 Perfil de expressão de genes homeobox em carcinoma mucoepidermoide tratado ou não com cisplatina

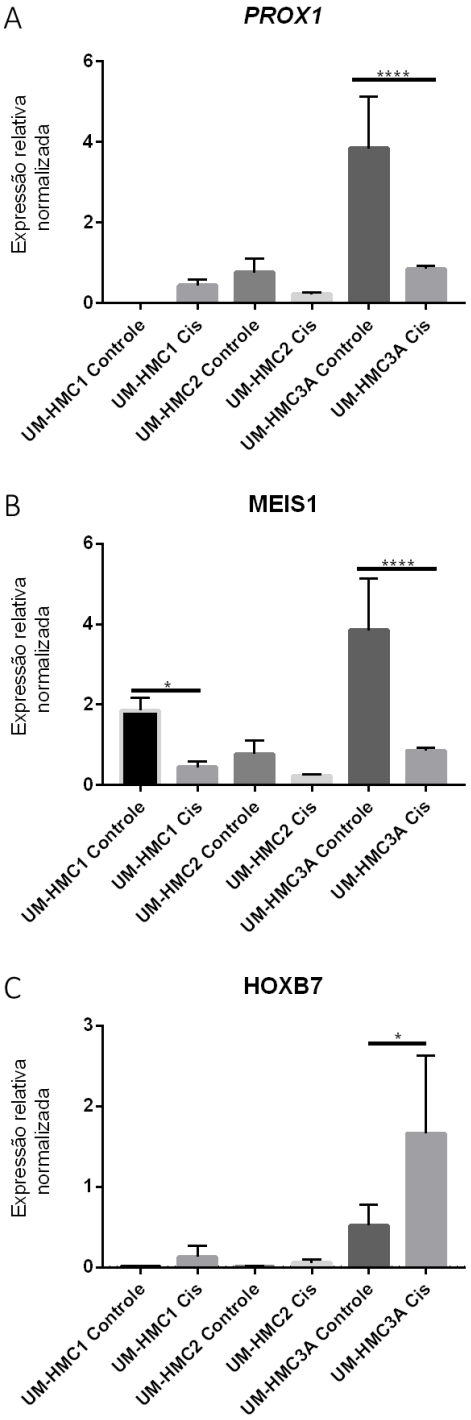
Baseado nos resultados anteriores o efeito da cisplatina sobre a expressão dos genes homeobox, foram analisados apenas nos genes *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7*.

A expressão do gene PROX1 (Figura 5.3A) aumentou na linhagem UM-HMC1 e reduziu na linhagem UM-HMC2 e UM-HMC3A quando tratadas com cisplatina. Sendo esta diferença estatisticamente significativa apenas na linhagem UM-HMC3A ($p<0,0001$).

Ao analisarmos a expressão do gene *MEIS1* (Figura 5.3B) observamos que houve redução da expressão nas células tratadas com cisplatina da linhagem UM-HMC1 ($p<0,023$) e UM-HMC3A ($p<0,0001$). A linhagem UM-HMC2 apresentou aumento da expressão do gene *MEIS1* no grupo tratado com cisplatina, embora não houve significância estatística para essa linhagem.

A expressão do gene *HOXB7* (Figura 5.3 C) aumentou nos grupos tratados com cisplatina, quando comparados com os seus respectivos grupos controles, este aumento foi estatisticamente significativo na linhagem celular UM-HMC3A ($P<0,02$).

Figura 5.3 - Expressão dos genes homeobox *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7* nas linhagens de carcinoma mucoepidermoide tratadas (Cisplatina) e não tratadas (Controle) com cisplatina. A, B e C. Expressão relativa (Fold Change). A, expressão do gene *PROX1*. B, expressão do gene *MEIS1*. C, expressão do gene *HOXB7*. ($^{*}p<0,05$; $^{****}p<0,0001$)



## 5.3 Análise da capacidade de formação de esferas pós tratamento com cisplatina

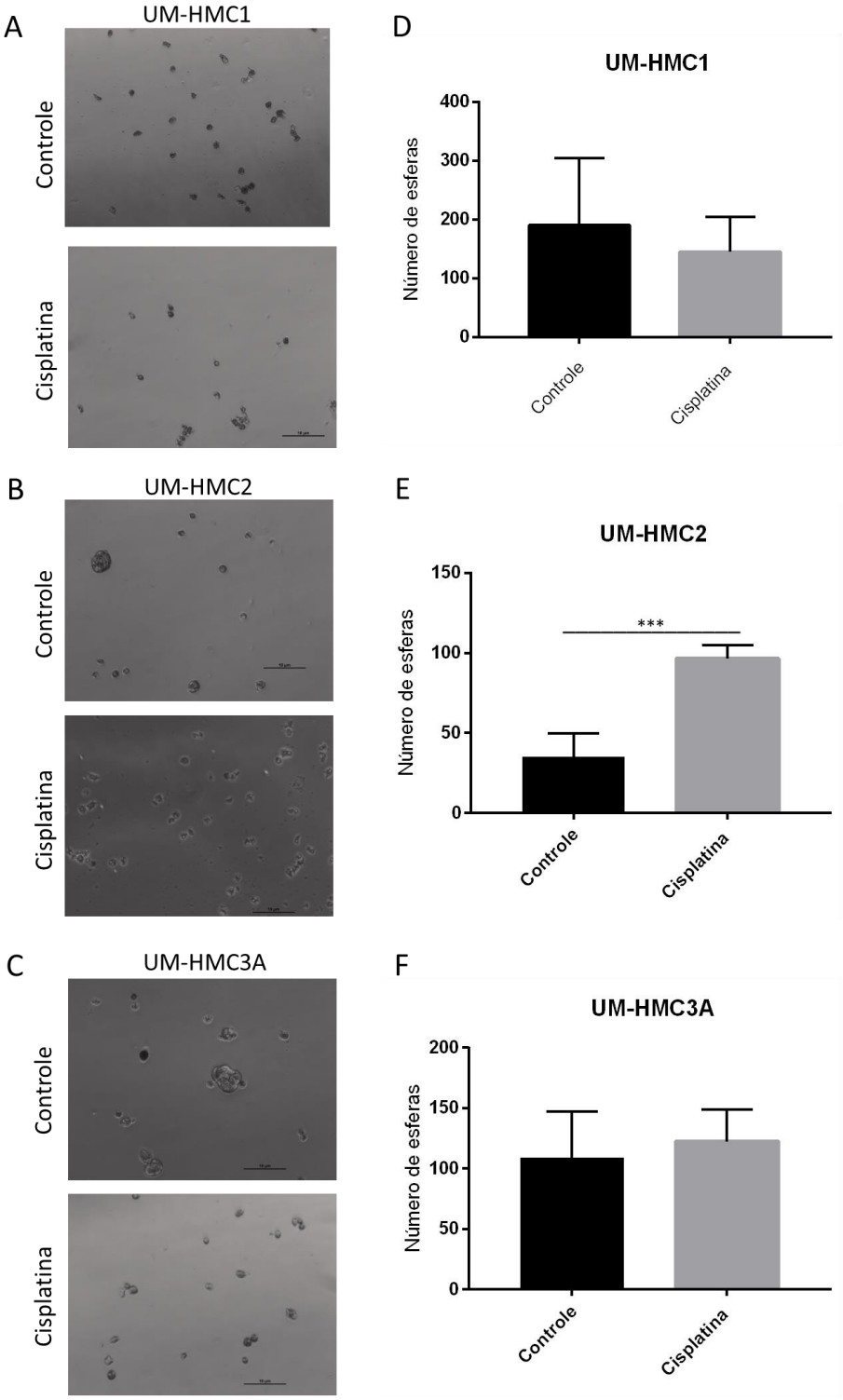
Para se verificar o efeito do quimioterápico cisplatina na capacidade de formação de esferas em células derivadas de carcinoma mucoepidermoide foi efetuado o ensaio de formação de esferas e, analisado o número de esferas formadas quando as células são previamente tratadas com cisplatina no período de 24h e grupo controle (sem tratamento).

Foi possível observar que na linhagem UM-HMC1 (Figura 5.4A) ocorreu decréscimo do número de esferas quando as células foram previamente tratadas com cisplatina, média de 145 (±59,4) esferas, em relação com o grupo controle, média de 190 (±133,8) esferas, porém sem diferença significativa.

Já na linhagem UM-HMC2 (Figura 5.4B), nas células previamente tratadas com cisplatina houve um considerável e surpreendente aumento no número de esferas formadas quando as células foram tratadas previamente com cisplatina, média de 96,5 (±8,2) esferas formadas, em relação a uma média de 35,25 (±14,7) das esferas formadas no grupo controle, sendo, para esta linhagem, a diferença estatisticamente significativos ($p<0,0003$).

Na linhagem UM-HMC3A (Figura 5.4C) ocorreu um discreto aumento, no número de esferas nas células tratadas previamente com cisplatina, média de 122.5 (±26,4), em contrapartida, o grupo controle a média foi de 109 (±38,3) esferas formadas, porém a diferença não apresentou significância.

Figura 5.4 - Ensaio de capacidade de formação de esferas em linhagens de carcinoma mucoepidermoide tratadas (Cisplatina) e não tratadas (Controle) com cisplatina. A, B e C, imagens fotomicroscópicas das áreas representativas das esferas formadas pelas linhagens UM-HMC1 (A), UM-HMC2 (B) e UM-HMC3A (C) 14 dias após o plaquamento das células em placas de 24 poços de baixa aderência, do grupo controle e grupo cisplatina. [Objetiva de 4x].E, F e G gráfico com o número médio de esferas formadas no 14º dia do ensaio. E, linhagem UM-HMC1. F, linhagem UM-HMC2. G, linhagem UM-HMC3A. ($^{***}P<0.0003$)



## 5.4 Análise da capacidade de migração celular por ensaio de ferida

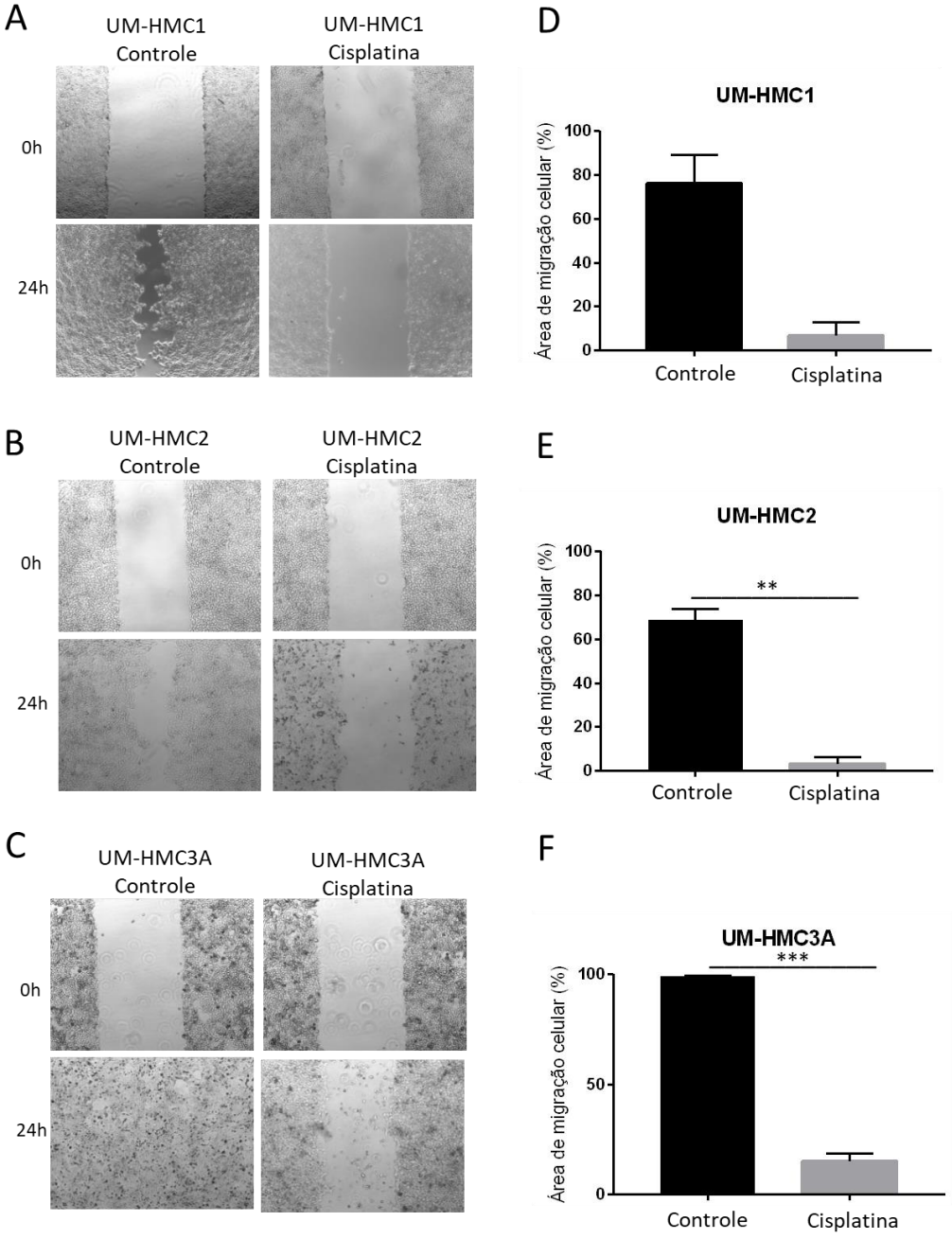
Com a finalidade de verificar se o quimioterápico pode influenciar na capacidade migratória das células foi efetuado o ensaio de ferida nas três linhagens e foi possível observar que a cisplatina foi capaz de reduzir a migração celular em todas as linhagens quando comparadas com seus respectivos grupos controles (sem tratamento).

A linhagem UM-HMC1 (Figura 5.5 A e D) no grupo controle foi capaz de fechar a área da ferida em 76,15% (±0.4), enquanto que quando tratada o fechamento da ferida foi de 6,82% (±12.8).

A linhagem UM-HMC2 (Figura 5.5 B e E) apresentou 69,03% (±4,7) no grupo controle, e quando tratada com cisplatina fechou a área de ferida em 3,30% (±1,8), apresentando uma diferença significativa de $p<0,05$. Para esta linhagem a diferença entre o grupo tratado com cisplatina e o não tratado foi estatisticamente significativo ($^{**}p<0,001$).

Na linhagem UM-HMC3A (Figura 5.5 C e F) houve 99,42% (±0,5) de fechamento da área de ferida no grupo controle, e quando tratada com cisplatina a área de ferida fechou em 15,03% (±3,6), apresentando uma diferença significativa ($^{***}p<0,0008$).

Figura 5.5 - Migração celular de linhagens de carcinoma mucoepidermoide tratadas (Cisplatina) e não tratadas (Controle) com cisplatina. A, B e C, imagens fotomicroscópicas das áreas de ferida das células UM-HMC1 (A), UM-HMC2 (B) e UM-HMC3A (C) no momento 0 horas e 24horas, dos grupos controle e grupo cisplatina. [Objetiva de 4x]. E, F e G gráfico com a porcentagem de área preenchida com células migratórias no período de 24horas. E, linhagem UM-HMC1. F, linhagem UM-HMC2. G, linhagem UM-HMC3A. ($^{**}p<0.001$; $^{***}p<0,0008$)



# 6 DISCUSSÃO

Sabe-se que o carcinoma mucoepidermoide é a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum e, apresenta maior frequência de metástase linfonodal. Já foram identificadas diversas alterações genéticas associadas ao processo de carcinogênese e ao desenvolvimento de metástases no carcinoma mucoepidermoide. Translocações genéticas, aberrações numéricas e estruturais de cromossomos, bem como alterações nas vias de sinalização celulares ocorrem frequentemente nesta neoplasia. (32) A cirurgia e a radioterapia são o tratamento de escolha, pois, a quimioterapia não tem mostrado muita eficiência para o tratamento destas neoplasias malignas principalmente quando recidivantes e/ou metastáticas (4), por isso, é necessário um melhor entendimento das diferentes vias de sinalização celular que promovem resistência das diferentes vias de sinalização celular que promovem a resistência das células tumorais quando sob tratamento dos quimioterápicos, como a cisplatina.

Os genes homeobox estão distribuídos em 12 classes e várias subclasses e famílias (http://homeodb.zoo.ox.ac.uk/families.get?og=Human), expressos em em inúmeros tecidos durante a embriogênese de vertebrados, e são importantes reguladores dos processos envolvidos na proliferação e desenvolvimento celular (95) (5) (96). Estes genes parecem estar alterados ou expressos de forma desregulada em uma ampla variedade de tumores humanos (8) (9) (10) (11) (13) (94) (95). A correlação dos padrões de expressão dos genes homeobox com a tumorigênese e a progressão do câncer não está ainda totalmente caracterizada (6) Os genes homeobox também foram associados à transição epitélio-mesenquimal (EMT) e à invasão tumoral, processos frequentemente associados à regulação positiva dos genes homeobox, que em condições normais estão expressos em níveis muito baixos (98). Além disso, não se sabe se expressão desses genes está relacionada à resposta ao tratamento pela cisplatina no carcinoma mucoepidermoide

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum) é um dos quimioterápicos mais utilizados em regimes quimioterapêuticos contra o câncer, incluindo o carcinoma mucoepidermoide, que é um agente a base de platina que age sobre o ciclo proliferativo das células, induzindo a senescência e apoptose celular (96) (95). Porém, estudos tem demonstrado que as linhagens utilizadas em nosso estudo possuem células quimiorresistentes à cisplatina, com perfil de células-tronco tumorais, sendo modelos de estudo para a análise de genes homeobox relacionados quimiorresistência de células tumorais à cisplatina (96).

Para verificar o efeito do quimioterápico cisplatina sobre a expressão de genes homeobox as células foram tratadas por 24h na concentração de 8,4ul/ml de cisplatina. Esta dose foi escolhida, pois afeta a viabilidade celular em torno de 50% das células de carcinoma mucoepidermoide UM-HMC3A, definida em estudo anterior, supostamente a linhagem mais agressiva dentre as três linhagens analisadas, pois a UM-HMC3A é derivada de carcinoma mucoepidermoide recidivante com presença de invasão angiolinfática e neural, sendo as linhagens UM-HMC1 e UM-HMC2 derivadas de tumores primários (Wagner et al., 2013). As três linhagens derivam de tumores originalmente graduados como do tipo intermediário e com estadiamento T4 (3).

Primeiramente foi analisada a expressão dos genes *PROX1, MEIS1, HOXB5, HOXB7* e *HOXB9* em cada linhagem para verificar se estes genes são expressos nestas linhagens. Os genes *HOXB5* e *HOXB9* não foram expressos nas linhagens analisadas.

Os genes *PROX1, MEIS1* e *HOXB7.* A linhagem UM-HMC3A apresentou maior expressão destes três genes, significativamente diferente das demais linhagens. É interessante que essa linhagem é a que deriva da neoplasia com maior agressividade. O gene *HOXB7* regula direta ou indiretamente a via do TGFβ, que está envolvido com os processos de proliferação e invasão tumoral em diversos tipos de carcinomas (53). Estudos demonstram que a superexpressão do gene *HOXB7* pode resultar em um fenótipo com um perfil mais agressivo, com perda de adesão celular e diversas outras alterações morfológica, levando à metástase (54) e contribui para a proliferação e tumorigênese (52). Relatos em carcinomas epidermoide de cavidade oral demonstram que este gene, quando superexpresso está relacionado à tumores com invasão do tecido vascular e alta proliferação das células tumorais (22).

Além disso, quando as três linhagens de carcinoma mucoepidermoide foram tratadas com cisplatina, as células remanescentes quimiorresistentes apresentaram aumento da expressão de *HOXB7*, o que sugere que esse gene possa estar relacionado com a expressão de proteínas relacionadas com a resistência ao tratamento com cisplatina

O gene *PROX1* também foi mais expresso na linhagem UM-HMC3A quando comparado às demais linhagens analisadas. A literatura já evidenciou que o gene *PROX1* além de ser um regulador transcricional envolvido na organogênese, também está envolvido em uma variedade de tipos de tumores (11,12, 13, 14, 18, 74, 99). Apesar de alterações na expressão de *PROX1* serem relatadas em várias formas de tumores, ainda não é esclarecido o papel que o PROX1 apresenta no carcinoma mucoepidermoide de boca (86). Porém, foi demonstrado que

a superexpressão do gene *PROX1* está relacionada à um comportamento mais agressivo em diversos tumores endoteliais (12). Em contrapartida, o *PROX1* se mostrou como um marcador significativo de melhor prognóstico em pacientes acometidos com tumores malignos intestinais (78). De mesma forma, no carcinoma epidermoide de boca, a superexpressão do *PROX1* está associada a uma redução da proliferação celular sugerindo que uma das funções do *PROX1* é a de gene supressor da carcinogênese oral (86). Curiosamente, a linhagem UM-HMC3A, a qual apresentou superexpressão do gene *PROX1* é uma linhagem de células já caracterizada, sendo essa linhagem derivada de um tumor recorrente, diferentemente das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC2, que são derivadas de tumores primários (3). Sugerindo uma participação importante do *PROX1* na manutenção de tumores mais agressivos.

O gene *PROX1* apresentou expressão variável entre as linhagens analisadas em nosso estudo, sendo expresso na UM-HMC1 apenas quando tratadas com cisplatina e reduzido nas UM-HMC2 e UM-HMC3A, tratadas. Estudo com células de câncer de cólon tem demonstrado que a inibição de *PROX1* promove maior resistência à apoptose celular em células tratadas com cisplatina, através do aumento da expressão do receptor de estrógeno *β* (*ERβ*, do inglês *Estrogen receptor β*) (92). Recentemente, pesquisadores têm demonstrado que o *ERβ* tem padrão de expressão imuno-histoquímica no núcleo das células de 50% dos casos de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar (97). O padrão de expressão citoplasmático ou nuclear parece conferir um diferente prognóstico à pacientes com câncer de mama, sendo a expressão nuclear relacionado à um prognóstico ruim (98). Os resultados da literatura associados ao nosso, permitem considerar que é interessante dar continuidade nesse estudo, aprofundando os a compreensão dos achados aqui descritos.

Comparando a expressão do *MEIS1* com a expressão de *PROX1* e *HOXB7* nas três linhagens, este foi comumente o mais expresso. O *MEIS1* é um ativador para os membros da família homeobox, como os genes *HOXA9*, *HOXA7* (65) e é também um cofator transcricional das proteínas *MEIS*, *PBX* e *HOX* todos exibindo propriedades específicas de ligação ao DNA (64). O gene *MEIS1* e participa do processo de autorrenovação celular de células-tronco normais (66). (67).

Quando as células foram tratadas com cisplatina foi possível observar em nossos resultados que a cisplatina reduziu a expressão de *MEIS1*. De acordo com o nosso conhecimento, não existem estudos da expressão de *MEIS1* em carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar, porém nossos achados corroboram com achados de Crijns com células

derivadas de câncer ovariano (99). Este estudo analisou 341 genes por *qPCR microarray* em quatro linhagens de câncer ovariano tratadas e não tratadas com cisplatina, e entre os genes analisados a redução da expressão do gene *MEIS1* foi detectada nas células quimiorresistentes e associado à expressão de *MEIS 2* e *PBX* (99). Porém mais estudos são necessários para entender o mecanismo de MEIS1 e a quimiorresistencia destes tumores, visto que este mesmo grupo analisou a expressão de MEIS1 em 232 casos de pacientes com câncer de ovário e comparando 44 amostras pareadas de pacientes pré e pós tratamento com quimioterápicos diversos, entre eles os derivados de platina, não foi possível encontrar alteração no padrão de expressão para este gene (93). Como as células-tronco tumorais compartilham propriedades, como a auto renovação de células-tronco normais, papéis significativos também podem ser interpretados para os fatores de transcrição no que se diz respeito sobre o desenvolvimento, progressão e a manutenção dos tumores (69). Adicionalmente o silenciamento do gene *MEIS1* em linhagens celulares de câncer de ovário é capaz de aumentar a sensibilidade das células quando tratadas com cisplatina (93). Sugerindo que o *MEIS1* pode estar presente em células com capacidade de autorrenovação tumoral.

Adicionalmente, para verificar o efeito da cisplatina sobre células clonogênica quimiorresistentes foi efetuado o ensaio de esfera. As esferas são colônias celulares que crescem em suspensão e são consideradas células tronco/progenitoras (100) (101) (102). Através deste ensaio foi possível observar, em nosso estudo, que a cisplatina reduziu discretamente o número de esferas nas linhagens UM-HMC1 e 3A, porém selecionou maior número de células formadoras de esferas na linhagem UM-HMC2. É importante salientar a que as células plaqueadas para este ensaio foram células que sobreviveram pós-tratamento com cisplatina, conferindo a formação de esferas quimiorresistentes. Sabe-se na literatura que a cisplatina parece não afetar as células com capacidade tronco-tumoral que expressam *MEIS1* (93). Um próximo passo para nosso estudo é analisar a expressão deste gene nas esferas celulares derivadas das células quimiorresistentes à cisplatina.

Outra propriedade relacionada às células quimiorresistentes e analisada em nosso estudo foi a migração celular. Neste ensaio, analisamos a área preenchida por células migratórias quando as células eram mantidas em contato com a cisplatina por 24 horas. Nossos achados demonstraram que a cisplatina foi capaz de reduzir a migração celular em todas as linhagens de carcinoma mucoepidermoide analisadas de forma significativa, o que é consistente com a literatura pertiente.

Nossos resultados sugerem que a redução da expressão de PROX1 e MEIS1 e aumento

da expressão de *HOXB7* podem estar relacionados à quimiorresistência das células de carcinoma mucoepidermoide à cisplatina. A cisplatina parece não reduzir de forma significativa a população de células-tronco tumorais. Assim, as análises efetuadas abrem precedentes para mais pesquisas a fim de explorar a participação dos genes homeobox nas células tumorais quimiorresistentes e com capacidade de autorrenovação do carcinoma mucoepidermoide.

# 7 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados, podemos concluir que:

1) As linhagens estudadas apresentam expressão diferente dos genes *PROX1*, *MEIS1* e *HOXB7* e ausência de expressão dos genes *HOXB5* e *HOXB9*.

2) O tratamento com cisplatina provocou redução da expressão dos genes *PROX1* e *MEIS1* e aumento da expressão de *HOXB7*.

3) As células tratadas com cisplatina mantiveram a capacidade de formar esferas, e mostraram redução da capacidade migratória.

**REFERÊNCIAS[1]**


1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. doi: 10.3322/caac.21208.

2. de Barros e Lima Bueno R, Ramão A, Pinheiro DG, Alves CP, Kannen V, Jungbluth AA, et al. HOX genes: potential candidates for the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. Tumour Biol. 2016 Nov;37(11):15087-15096.

3. Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, et al. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary Oral Oncol. 2013 Nov;49(11):1059-66. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.08.004. Epub 2013 Sep 12.

4. Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. Oral Oncol. 2003 Apr;39(3):207-12.

5. Dunwell TL, Holland PWH. Diversity of human and mouse homeobox gene expression in development and adult tissues. BMC Dev Biol. 2016 Nov 3;16(1):40.

6. Hur H, Lee J-Y, Yun HJ, Park BW, Kim MH. Analysis of HOX Gene Expression Patterns in Human Breast Cancer. Mol Biotechnol. 2014 Jan;56(1):64-71. doi: 10.1007/s12033-013-9682-4.

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

8. Xiao F, Chen Z, Zeng X, Bai Y, Guo L, Li Y. Role of homeobox gene A5 in multidrug resistance of human small cell lung cancer cells. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2013 Nov;33(11):1665-8.

9. Makiyama K, Hamada J-I, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. Oncol Rep. 2005 Apr;13(4):673-9.

10. Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo J V., et al. Inactivation


[1] De acordo com Estilo Vancouver.

of HOXA Genes by Hypermethylation in Myeloid and Lymphoid Malignancy is Frequent and Associated with Poor Prognosis. Clin Cancer Res. 2007 Sep 1;13(17):5048-55.

11. Skog M, Bono P, Lundin M, Lundin J, Louhimo J, Linder N, et al. Expression and prognostic value of transcription factor PROX1 in colorectal cancer. Br J Cancer. 2011 Oct 25;105(9):1346-51. doi: 10.1038/bjc.2011.297.

12. Dadras SS, Skrzypek A, Nguyen L, Shin JW, Schulz MMP, Arbiser J, et al. Prox-1 Promotes Invasion of Kaposiform Hemangioendotheliomas. J Invest Dermatol. 2008 Dec;128(12):2798-806. doi: 10.1038/jid.2008.176.

13. Nagai H, Li Y, Hatano S, Toshihito O, Yuge M, Ito E, et al. Mutations and aberrant DNA methylation of thePROX1 gene in hematologic malignancies. Genes Chromosomes Cancer. 2003 Sep;38(1):13-21.

14. 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. 2007 Aug 1;121(3):547-54.

15. Takahashi M, Yoshimoto T, Shimoda M, Kono T, Koizumi M, Yazumi S, et al. Loss of Function of the Candidate Tumor Suppressor prox1 by RNA Mutation in Human Cancer Cells. Neoplasia. 2006 Dec;8(12):1003-10.

16. Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, Kono T, Ikai I, Kubo H. A Homeobox Protein, Prox1, Is Involved in the Differentiation, Proliferation, and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res. 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):6005-11.

17. Dudas J, Mansuroglu T, Moriconi F, Haller F, Wilting J, Lorf T, et al. Altered regulation of Prox1-gene-expression in liver tumors. BMC Cancer. 2008 Apr 9;8:92. doi: 10.1186/1471-2407-8-92.

18. Yoshimoto T, Takahashi M, Nagayama S, Watanabe G, Shimada Y, Sakasi Y, et al. RNA mutations of prox1 detected in human esophageal cancer cells by the shifted termination assay. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jul 27;359(2):258-62.

19. Moskow JJ, Bullrich F, Huebner K, Daar IO, Buchberg AM. Meis1, a PBX1-Related Homeobox Gene Involved in Myeloid Leukemia in BXH-2 Mice Mol Cell Biol. 1995 Oct;15(10):5434-43.

20. di Pietro M, Lao-Sirieix P, Boyle S, Cassidy A, Castillo D, Saadi A, et al. Evidence for a functional role of epigenetically regulated midcluster HOXB genes in the development of Barrett esophagus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 5;109(23):9077-82. doi: 10.1073/pnas.1116933109.

21. Citation: Luo J, Cai Q, Wang W, Huang H, Zeng H. MicroRNA-7 Binding Site Polymorphism in HOXB5 Leads to Differential Gene Expression in Bladder Cancer. PLoS One. 2012;7(6):e40127. doi: 10.1371/journal.pone.0040127.

22. Kar SP, Tyrer JP, Li Q, Lawrenson K, Aben KKH, Anton-Culver H, et al. Network-Based Integration of GWAS and Gene Expression Identifies a HOX-Centric Network Associated with Serous Ovarian Cancer Risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2015 Oct;24(10):1574-84. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-1270.

23. Sha S, Gu Y, Xu B, Hu H, Yang Y, Kong X, et al. Decreased expression of HOXB9 is related to poor overall survival in patients with gastric carcinoma. Dig Liver Dis. 2013 May;45(5):422-9. doi: 10.1016/j.dld.2012.12.004. Epub 2013 Jan 14.

24. Lee J-Y, Hur H, Yun HJ, Kim Y, Yang S, Kim S Il, et al. HOXB5 Promotes the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. Int J Biol Sci. 2015 May 1;11(6):701-11. doi: 10.7150/ijbs.11431.

25. Carrera M, Bitu CC, de Oliveira CE, Cervigne NK, Graner E, Manninen A, et al. HOXA10 controls proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Apr 1;8(4):3613-23.

26. Darda L, Hakami F, Morgan R, Murdoch C, Lambert DW, Hunter KD. The Role of HOXB9 and miR-196a in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Yeudall A, PLoS One. 2015 Apr 10;10(4):e0122285. doi: 10.1371/journal.pone.0122285.

27. Fang L, Xu Y, Zou L. Overexpressed homeobox B9 regulates oncogenic activities by transforming growth factor-β1 in gliomas. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Mar 28;446(1):272-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.095.

28. Bell RB, Dierks EJ, Homer L, Potter BE. Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Jul;63(7):917-28.

29. Ozawa H, Tomita T, Sakamoto K, Tagawa T, Fujii R, Kanzaki S, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the head and neck: Clinical analysis of 43 patients. Jpn J Clin Oncol. 2008 Jun;38(6):414-8. doi: 10.1093/jjco/hyn045.

30. Batsakis JG. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980 Mar;49(3):229-32.

31. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell. 1996 Oct 18;87(2):159-70.

32. Tirado Y, Williams MD, Hanna EY, Kaye FJ, Batsakis JG, El-Naggar AK. CRTC1/MAML2 fusion transcript in high grade mucoepidermoid carcinomas of salivary and thyroid glands and Warthin's tumors: Implications for histogenesis and biologic behavior. Genes Chromosomes Cancer. 2007 Jul;46(7):708-15.

33. Wang K, McDermott JD, Schrock AB, Elvin JA, Gay L, Karam SD, et al. Comprehensive genomic profiling of salivary mucoepidermoid carcinomas reveals frequent BAP1, PIK3CA, and other actionable genomic alterations. Ann Oncol. 2017 Apr 1;28(4):748-753. doi: 10.1093/annonc/mdw689.

34. Noda H, Okumura Y, Nakayama T, Miyabe S, Fujiyoshi Y, Hattori H, et al. Clinicopathological significance of *MAML2* gene split in mucoepidermoid carcinoma. Cancer Sci. 2013 Jan;104(1):85-92. doi: 10.1111/cas.12039. Epub 2012 Nov 8.

35. Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: Vertebrate homeobox genes cations and EMBL/Genebank entries we have assembled. Mechanisms Development 1996;55:91-103

36. Lewis MT. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. Breast Cancer Breast Cancer Res. 2000;2(3):158-69.

37. Shrestha B, Ansari KI, Bhan A, Kasiri S, Hussain I, Mandal SS. Homeodomain-containing protein HOXB9 regulates expression of growth and angiogenic factors, facilitates tumor growth in vitro and is overexpressed in breast cancer tissue. FEBS J. 2012 Oct;279(19):3715-3726. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08733.x.

38. Platais C, Hakami F, Darda L, Lambert DW, Morgan R, Hunter KD. The role of HOX genes in head and neck squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2016 Apr;45(4):239-47. doi: 10.1111/jop.12388.

39. Patterson LT, Potter SS. Atlas of Hox gene expression in the developing kidney. Dev Dyn. 2004 Apr;229(4):771-9.

40. Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body Dev Biol. 2010 Aug 1;344(1):7-15. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.024.

41. Fienberg AA, Utset MF, Bogarad LD, Hart CP, Awgulewitsch A, Ferguson-Smith A, et al. Homeo box genes in murine development. Curr Top Dev Biol. 1987;23:233–56.

42. Ikeda K, Ookawara S, Sato S, Ando Z, Kageyama R, Kawakami K. Six1 is essential for early neurogenesis in the development of olfactory epithelium. Dev Biol. 2007 Nov 1;311(1):53-68.

43. Andrew DJ, Henderson KD, Seshaiah P. Salivary gland development in Drosophila melanogaster. Mech Dev. 2000 Mar 15;92(1):5-17.

44. Shaw PA, Zhang X, Russo AF, Amendt BA, Henderson S, Williams V. Homeobox Protein, Hmx3, in Postnatally Developing Rat Submandibular Glands. J Histochem Cytochem. 2003 Mar;51(3):385-96.

45. Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ, Featherstone MS. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. Mol Cell Biol. 2000 Nov;20(22):8623-33.

46. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. Nat Rev Cancer. Nat Rev Cancer. 2010 May;10(5):361-71. doi: 10.1038/nrc2826.

47. Volpe M V., Martin A, Vosatka RJ, Mazzoni CL, Nielsen HC. Hoxb-5 expression in the developing mouse lung suggests a role in branching morphogenesis and epithelial cell fate. Histochem Cell Biol. 1997 Dec;108(6):495-504.

48. Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers. J Mol Med (Berl). 2014 Aug;92(8):811-23. doi: 10.1007/s00109-014-1181-y.

49. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic Genes and the Homeobox Annu Rev Genet. 1986;20:147-73.

50. Bitu CC, Carrera M, Lopes MA, Kowalski LP, Soares FA, Coletta RD. HOXB7 expression is a prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. Histopathology. 2012 Mar;60(4):662-5. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04102.x.

51. Fu M, Chi Hang Lui V, Har Sham M, Nga Yin Cheung A, Kwong Hang Tam P. HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. Dev Dyn. 2003 Sep;228(1):1-10.

52. Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. Int J Cancer. 1992 Jul 30;51(6):892-7.

53. Hong C-S, Jeong O, Piao Z, Guo C, Jung M-R, Choi C, et al. HOXB5 induces invasion and migration through direct transcriptional up-regulation of β-catenin in human gastric carcinoma. Biochem J. 2015 Dec 15;472(3):393-403. doi: 10.1042/BJ20150213.

54. Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, et al. HOXB7, Homeodomain Protein, Is Overexpressed in Breast Cancer and Confers Epithelial-Mesenchymal Transition. Cancer Res. 2006 Oct 1;66(19):9527-34.

55. Chen K-N, Gu Z-D, Ke Y, Li J-Y, Shi X-T, Xu G-W, et al. Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2005 Feb 1;11(3):1044-9.

56. Liu S, Jin K, Hui Y, Fu J, Jie C, Feng S, et al. HOXB7 Promotes Malignant Progression by Activating the TGF  Signaling Pathway. Cancer Res. 2015 Feb 15;75(4):709-19. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3100.

57. Seki H, Hayashida T, Jinno H, Hirose S, Sakata M, Takahashi M, et al. HOXB9 expression promoting tumor cell proliferation and angiogenesis is associated with clinical outcomes in breast cancer patients. Ann Surg Oncol. 2012 Jun;19(6):1831-40. doi: 10.1245/s10434-012-2295-5.

58. Zhan J, Wang P, Niu M, Wang Y, Zhu X, Guo Y, et al. High expression of transcriptional factor HoxB9 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Histopathology. 2015 Jun;66(7):955-65. doi: 10.1111/his.12585.

59. Fonseca FP, Bingle L, Santos-Silva AR, Lopes MA, Coletta RD, de Andrade BAB, et al. Immunoexpression of hoxb7 and hoxb9 in salivary gland tumours. J Oral Pathol Med. 2016 Oct;45(9):672-681. doi: 10.1111/jop.12438

60. Nagel S, Burek C, Venturini L, Scherr M, Quentmeier H, Meyer C, et al. Comprehensive analysis of homeobox genes in hodgkin lymphoma cell lines identifies dysregulated expression of HOXB9 mediated via ERK5 signaling and BMI1. Blood. 2007 Apr 1;109(7):3015-23.

61. Moens CB, Selleri L. Hox cofactors in vertebrate development. Dev Biol. 2006 Mar 15;291(2):193-206. Epub 2006 Mar 3.

62. Mann RS, Affolter M. Hox proteins meet more partners. Curr Opin Genet Dev. 1998 Aug;8(4):423-9.

63. Kamps MP, Murre C, Sun X, Baltimore D. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B all. Cell. 1990 Feb 23;60(4):547-55.

64. Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M. Homeodomain Transcription Factor Meis1 Is a Critical Regulator of Adult Bone Marrow Hematopoiesis. PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e87646. doi: 10.1371/journal.pone.0087646.

65. Hisa T, Spence SE, Rachel RA, Fujita M, Nakamura T, Ward JM, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):450-9.

66. Azcoitia V, Aracil M, Martínez-A C, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. Dev Biol. 2005 Apr 15;280(2):307-20.

67. Penkov D, San Martín DM, Fernandez-Díaz LC, Rosselló CA, Torroja C, Sánchez-Cabo F, et al. Analysis of the DNA-Binding Profile and Function of TALE Homeoproteins Reveals Their Specialization and Specific Interactions with Hox Genes/Proteins. Cell Rep. 2013 Apr 25;3(4):1321-33. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.029.

68. Chariot A, Gielen J, Merville M-P, Bours V. The homeodomain-containing proteins: an update on their interacting partners. Biochem Pharmacol. 1999 Dec 15;58(12):1851-7.

69. Cai M, Langer EM, Gill JG, Satpathy AT, Albring JC, KC W, et al. Dual actions of Meis1 inhibit erythroid progenitor development and sustain general hematopoietic cell proliferation. Blood. 2012 Jul 12;120(2):335-46. doi: 10.1182/blood-2012-01-403139. Epub 2012 Jun 4.

70. Tucker ES, Lehtinen MK, Maynard T, Zirlinger M, Dulac C, Rawson N, et al. Proliferative and transcriptional identity of distinct classes of neural precursors in the mammalian olfactory epithelium. Development. 2010 Aug 1;137(15):2471-81. doi: 10.1242/dev.049718. Epub 2010 Jun 23.

71. Aksoz M, Turan RD, Albayrak E, Kocabas F. Emerging Roles of Meis1 in Cardiac Regeneration, Stem Cells and Cancer. Curr Drug Targets. 2018;19(2):181-190. doi: 10.2174/1389450118666170724165514.

72. Rad A, Farshchian M, Forghanifard MM, Matin MM, Bahrami AR, Geerts D, et al. Predicting the molecular role of MEIS1 in esophageal squamous cell carcinoma. Tumour Biol. 2016 Feb;37(2):1715-25. doi: 10.1007/s13277-015-3780-9.

73. Giordano TJ, Shedden KA, Schwartz DR, Kuick R, Taylor JMG, Lee N, et al. Organ-Specific Molecular Classification of Primary Lung, Colon, and Ovarian Adenocarcinomas Using Gene Expression Profiles. Am J Pathol. 2001 Oct;159(4):1231-8.

74. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Goldman B, et al. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. Cancer Genet Cytogenet. 2005 Jul 1;160(1):35-42.

75. Lin L, Huang M, Shi X, Mayakonda A, Hu K, Jiang Y-Y, et al. Super-enhancer-associated MEIS1 promotes transcriptional dysregulation in Ewing sarcoma in co-operation with EWS-FLI1. Nucleic Acids Res. 2018 Nov 28. doi: 10.1093/nar/gky1207.

76. Elsir T, Smits A, Lindström MS, Nistér M. Transcription factor PROX1: its role in development and cancer. Cancer Metastasis Rev. 2012 Dec;31(3-4):793-805. doi: 10.1007/s10555-012-9390-8

77. Zinovieva RD, Duncan MK, Johnson TR, Torres R, Polymeropoulos MH, Tomarev SI. Structure and Chromosomal Localization of the Human Homeobox Gene Prox 1. Genomics. 1996 Aug 1;35(3):517-22.

78. Banerjee-Basu S, Landsman D, Baxevanis AD. In silico biology. Vol. 1, In Silico Biology. IOS Press; 1998. 163-173 p.

79. Ryter JM, Doe CQ, Matthews BW. Structure of the DNA Binding Region of Prospero Reveals a Novel Homeo-Prospero Domain nuclear localization of Prospero in neuroblasts show misexpression of GMC-specific genes. Structure. 2005 Apr;13(4):601-7.

80. Laitinen A, Bö Ckelman C, Hagströ J, Kokkola A, Kallio P, Haglund C. High PROX1 expression in gastric cancer predicts better survival. PLoS One. 2017 Aug 30;12(8):e0183868. doi: 10.1371/journal.pone.0183868.

81. Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. Nat Genet. 1999 Mar;21(3):318-22.

82. Kaltezioti V, Kouroupi G, Oikonomaki M, Mantouvalou E, Stergiopoulos A. Prox1 Regulates the Notch1-Mediated Inhibition of Neurogenesis. PLoS Biol. 2010 Dec 21;8(12):e1000565. doi: 10.1371/journal.pbio.1000565.

83. Burke Z, Oliver G. Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. Mech Dev. 2002 Oct;118(1-2):147-55.

84. Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. Nat Genet. 2000 Jul;25(3):254-5.

85. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. EMBO J. 2002 Apr 2;21(7):1505-13.

86. Risebro CA, Searles RG, Melville AAD, Ehler E, Jina N, Shah S, et al. Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. Development. 2009 Feb;136(3):495-505. doi: 10.1242/dev.030007.

87. Park K-J, Cho S-B, Park Y-L, Kim N, Park S-Y, Myung D-S, et al. Prospero homeobox 1 mediates the progression of gastric cancer by inducing tumor cell proliferation and lymphangiogenesis. Gastric Cancer. 2017 Jan;20(1):104-15. doi: 10.1007/s10120-015-0592-y.

88. 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 Medicine (Baltimore). 2014 Dec;93(28):e192.

89. Dadras SS, Skrzypek A, Nguyen L, Shin JW, Schulz MMP, Arbiser J, et al. Prox-1 Promotes Invasion of Kaposiform Hemangioendotheliomas. J Invest Dermatol. 2008 Dec;128(12):2798-806. doi: 10.1038/jid.2008.176.

90. Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2010 May;46(5):373-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.02.014.

91. Hung C-C, Chien C-Y, Chu P-Y, Wu Y-J, Lin C-S, Huang C-J, et al. Differential resistance to platinum-based drugs and 5-fluorouracil in p22phox-overexpressing oral squamous cell carcinoma: Implications of alternative treatment strategies. Head Neck. 2017 Aug;39(8):1621-1630. doi: 10.1002/hed.24803.

92. Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Tojyo I, Matsumoto T, Kiga N, et al. EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. Pathol Oncol Res. 2008 Mar;14(1):39-43. doi: 10.1007/s12253-008-9020-5.

93. Tsai L-L, Yu C-C, Chang Y-C, Yu C-H, Chou M-Y. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2011 Sep;40(8):621-8. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01015.x

94. Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, et al. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. Oncotarget. 2015 Sep 29;6(29):26633-50. doi: 10.18632/oncotarget.5782.

95. Mochizuki D, Adams A, Warner KA, Zhang Z, Pearson AT, Misawa K, et al. Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. Oncotarget. 2015 Sep 8;6(26):22822-35.

96. Edvardsson K, Ström A, Jonsson P, Gustafsson J-Å, Williams C. Estrogen receptor β induces antiinflammatory and antitumorigenic networks in colon cancer cells. Mol Endocrinol. 2011 Jun;25(6):969-79. doi: 10.1210/me.2010-0452.

97. Crijns APG, de Graeff P, Geerts D, ten Hoor KA, Hollema H, van der Sluis T, et al. MEIS and PBX homeobox proteins in ovarian cancer. Eur J Cancer. 2007 Nov;43(17):2495-505. Epub 2007 Oct 18.

98. Andry G, Hamoir M, Locati LD, Licitra L, Langendijk JA. Management of salivary gland tumors. Expert Rev Anticancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2012 Sep;12(9):1161-8. doi: 10.1586/era.12.92.

99. Guimarães DM, Almeida LO, Martins MD, Warner KA, Silva ARS, Vargas PA, et al. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. Oncotarget. 2016 Jul 5;7(27):42447-42460. doi: 10.18632/oncotarget.9884.

100. Aquino G, Collina F, Sabatino R, Cerrone M, Longo F, Ionna F, et al. Sex Hormone Receptors in Benign and Malignant Salivary Gland Tumors: Prognostic and Predictive Role. Int J Mol Sci. 2018 Jan 30;19(2). pii: E399. doi: 10.3390/ijms19020399.

101. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA, Harkins L, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2008 Aug 15;14(16):5228-35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4528.

102. Crijns AP, Gerbens F, Edo Plantinga AD, Jan Meersma G, de Jong S, Hofstra RM, et al. A biological question and a balanced (orthogonal) design: the ingredients to efficiently analyze two-color microarrays with Confirmatory Factor Analysis. BMC Genomics. 2006 Sep 12;7:232.

103. Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro Ki, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. Int J Cancer. 2001 Aug 15;93(4):489-96.

104. Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. Head Neck. 2013 Jul;35(7):1015-21. doi: 10.1002/hed.23076

105. Nör C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, Helman JI, et al. Cisplatin Induces Bmi-1 and Enhances the Stem Cell Fraction in Head and Neck Cancer. Neoplasia. 2014 Feb;16(2):137-46. doi: 10.1593/neo.131744.

ANEXO A – Comprovante de Envio do Projeto ao Comitê de Ética

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Plataforma Brasil

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermóide tratadas com cisplatina

**Pesquisador:** Fabio Daumas Nunes

**Versão:** 1

**CAAE:** 71697817.0.0000.0075

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**DADOS DO COMPROVANTE**

**Número do Comprovante:** 082207/2017

**Patrocionador Principal:** Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermóide tratadas com cisplatina que tem como pesquisador responsável Fabio Daumas Nunes, foi recebido para análise ética no CEP USP - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo ¿ FOUSP em 24/07/2017 às 14:57.

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PlataForma Brasil

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermóide tratadas com cisplatina

**Pesquisador:** Fabio Daumas Nunes

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 71697817.0.0000.0075

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.065.636

**Apresentação do Projeto:**

Uma vez que os genes da família homeobox são importantes nos processos normais de desenvolvimento tecidual e embriogênese, e também estão relacionados aos processos neoplásicos como proliferação, migração e invasão tumoral. O presente estudo visa avaliar a expressão dos genes homeobox (PROX1, HOXB7 e HOXB9) em células de carcinoma mucoepidermóide, tratadas com cisplatina.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste estudo é avaliar a expressão dos genes homeobox em células de carcinoma mucoepidermóide tratadas com cisplatina.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os autores, os riscos presentes no projeto são inerentes à manipulação de material biológico em ambiente laboratorial e o benefício é trazer melhor conhecimento sobre o comportamento de células de carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar, frente ao tratamento com o conhecido quimioterápico de predileção à cânceres de cabeça e pescoço, a cisplatina.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de solicitação de emenda, pois após o exame de qualificação do aluno, foi sugerido, pela banca avaliadora, que fossem adicionados ao projeto a avaliação através do RT-qPCR dos

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

respectivos genes: HOXBS; HOXB13; MEISI . Além disso, foi sugerido a adição de um novo protocolo experimental de Imunocitoquímica de Fluorescência para os anticorpos SLUG, SNAIL e TWIST.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores apresentaram uma declaração justificando o pedido da emenda, novo documento do projeto completo e do formulário de informações básicas do projeto. As metodologias foram descritas no projeto completo.

**Recomendações:**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|---|---|---|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1244682_E1.pdf | 14/11/2018 15:12:34 | | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_Rosto.pdf | 14/11/2018 15:12:03 | Robson dos Santos Cordeiro | Aceito |
| Outros | Projeto_Mestrado_Robson_corr.pdf | 13/11/2018 13:33:27 | Fabio Daumas Nunes | Aceito |
| Outros | Declaracao.pdf | 24/10/2018 17:01:49 | Robson dos Santos Cordeiro | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Ausencia_TCLE.pdf | 07/06/2017 17:58:04 | Fabio Daumas Nunes | Aceito |
| Declaração de | Autorizacao.jpg | 07/06/2017 | Fabio Daumas | Aceito |

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.065.636

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Autorizacao.jpg | 17:57:50 | Nunes | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Mestrado_Robson.pdf | 07/06/2017 17:51:45 | Fabio Daumas Nunes | Aceito |

**Situação do Parecer:**
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**
Não

SAO PAULO, 07 de Dezembro de 2018

**Assinado por:**
**Maria Gabriela Haye Biazevic**
**(Coordenador(a))**