

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

ANA CAROLINA BUZZO STEFANINI

**Oncogenes E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16 e
mediadores de inflamação regulam a transição epitélio-
mesenquimal em células de carcinoma de cabeça e pescoço**

**Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes and
inflammatory mediators regulate epithelial-mesenchymal
transition in head and neck carcinoma cells**

São Paulo

2019

ANA CAROLINA BUZZO STEFANINI

**Oncogenes E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16 e
mediadores de inflamação regulam a transição epitélio-
mesenquimal em células de carcinoma de cabeça e pescoço**

**Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes and
inflammatory mediators regulate epithelial-mesenchymal
transition in head and neck carcinoma cells**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Eloiza Helena Tajara

São Paulo

2019

Stefanini, Ana Carolina B.
Oncogenes E6 e E7 do papilomavirus
humano tipo 16 e mediadores de
inflamação regulam a transição epitélio-
mesenquimal em células de carcinoma de
cabeça e pescoço, 90 f.

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Transição epitélio-mesenquimal. 2.
HPV16. 3. Citocinas inflamatórias.
I. Tajara, Eloiza. II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva. III. Título.

Stefanini, ACB. Oncogenes E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16 e mediadores de inflamação regulam a transição epitelio-mesenquimal em células de carcinoma de cabeça e pescoço. 2019. 90f Tese (Doutorado em ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

Dedico

À minha família, especialmente a meu pai

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Eloiza Helena Tajara pelo apoio e dedicação. Pelo exemplo profissional de ética, respeito, honestidade e determinação. Por acompanhar e ser o molde da minha evolução pessoal e profissional.

Aos meus amigos Dr. Tiago Henrique, Dra. Bianca Rodrigues da Cunha e Dra. Carolina Pacca Mazaro por todos os ensinamentos, apoio, amizade e carinho.

À Dra. Ana Carolina Terzian pela doação do plasmídeo, pelo apoio científico e solicitude sempre.

À Dra. Patrícia Severino e Dr. Fábio Nunes pela atenção, inspiração, exemplo profissional e auxílio para o desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo pela disponibilidade, solicitude e auxílio científico.

Aos coordenadores e funcionários do programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências da USP, profissionais extremamente competentes, solícitos e atenciosos.

Ao CNPq (conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico) pelo auxílio financeiro.

À meu pai, pelo apoio incondicional, pelo amor, cuidado, carinho e respeito. Pela dedicação e auxílio na minha construção pessoal e profissional. À Márcia, pela delicadeza, amor e compreensão.

Aos meus irmãos Georgia e Miguel pela leveza e felicidade de vida.

Ao meu parceiro André pelo amor, respeito e por auxiliar a minha evolução pessoal.

À toda minha família, Cláudia, João, Cecília, Gabriel, Raquel, Vera, Ana, Maria Eliza, Gabriela, Sirlei, João Bosco, João Gabriel e Rita pelo amor, afeto e por darem significado a minha vida e felicidade.

RESUMO

Stefanini, ACB. **Oncogenes E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16 e mediadores de inflamação regulam a transição epitélio-mesenquimal em células de carcinoma de cabeça e pescoço**, 2019. 90f Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é uma das neoplasias mais frequentes e geralmente está associado a inflamação crônica. Seus principais fatores de risco são a exposição ao tabaco e ao álcool. Publicações recentes sugerem que a infecção por papiloma vírus humano (HPV) de alto risco está relacionada à tumorigênese de cabeça e pescoço e pode alterar o comportamento e o desfecho deste tumor. A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo importante durante a tumorigênese pelo qual células epiteliais adquirem um fenótipo migratório e invasivo. O papel da infecção por HPV e da inflamação nesse processo ainda não é bem compreendido em CECP. No presente estudo, foi investigado o efeito de transcritos E6/E7 de HPV 16 e microambientes inflamatórios em EMT utilizando linhagens celulares derivadas de queratinócitos normais e de carcinomas de língua e orofaringe (HaCat, SCC25 e FaDu, respectivamente). Os resultados mostraram que a expressão de HPV E6/E7 modificou a morfologia das células normais e de câncer de língua. A expressão de E6/E7 e a presença de mediadores de inflamação em queratinócitos normais aumentaram a invasão, mas diminuíram as taxas de proliferação, viabilidade e migração. Por outro lado, células de carcinoma oral transfectadas com E6/E7 apresentaram aumento da proliferação, viabilidade e invasão e um efeito inverso quando mediadores de inflamação foram adicionados ao meio de cultura dessas células. Além disso, E6/E7 e mediadores inflamatórios diminuíram a expressão gênica de marcadores de EMT e inflamatórios em células de carcinoma bucal, mas aumentaram em queratinócitos normais e em células de carcinoma de hipofaringe. Deve ser destacado que o efeito da IL-6 diferiu dos observados para a associação de TNF- α , TGF-beta ou IL6/TNF- α /TGF-beta. Em conclusão, a indução de EMT pela infecção por HPV e processos inflamatórios pode ser dependente do sítio anatômico e do microambiente tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Transição Epitelio-Mesenquimal, HPV 16, Mediadores inflamatórios, Câncer de Cabeça e Pescoço.

ABSTRACT

Stefanini, ACB. **Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes and inflammatory mediators regulate epithelial-mesenchymal transition in head and neck carcinoma cells.** 2019. 90f Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are one of the most frequent neoplasias and is often associated with chronic inflammation. Its main risk factors are tobacco and alcohol exposition. Recent publications suggest that the infection by high-risk human papillomavirus (HPV) is related to head and neck tumorigenesis and may alter tumor behavior and outcome. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an important process during tumorigenesis by which epithelial cells gain a migratory and invasive phenotype. The role of HPV infection and inflammation on this process are still not well understood in HNSCC. In the present study, we investigated the effect of E6/E7 HPV 16 transcripts and inflammatory microenvironments on EMT in cell lines derived from normal keratinocytes and from tongue and oropharyngeal carcinomas (HaCat, SCC25 and FaDu, respectively). The results showed that HPV E6/E7 expression modified the morphology of normal and tongue cancer cells. HPV E6/E7 expression and the presence of inflammation mediators in normal keratinocytes increased invasion, but decreased proliferation, viability and migration rates. E6/E7 transfected oral carcinoma cells showed increased proliferation, viability and invasion and an inverse effect was observed when mediators of inflammation were added to the medium culture of the same cells. In addition, E6/E7 and inflammatory mediators decreased EMT marker and inflammatory gene expression in oral carcinoma cells, but increased in normal keratinocytes and hypopharyngeal carcinoma cells. IL-6 effect also differed compared with the ones observed for TNF-a, TGF-beta or IL6/TNF-a/TGF-beta association. In conclusion, EMT induction by HPV infection and inflammatory processes may be dependent on the anatomical site and tumor microenvironment in head and neck carcinomas

Keywords: Epithelial-Mesenchymal Transition, HPV 16, Inflammatory Mediators, Head and Neck neoplasms.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	01
II - OBJETIVOS	24
III - MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Materiais	25
2. Métodos	25
IV – RESULTADOS	40
V – DISCUSSÃO	69
VI – CONCLUSÃO	75
VII – REFERÊNCIAS	77
VIII – ANEXOS	90

INTRODUÇÃO

CÂNCER

Durante o desenvolvimento do câncer, as células tumorais adquirem uma série de características fenotípicas que permitem sua proliferação, invasão dos tecidos adjacentes e formação de metástase. Para melhor compreender a biologia do câncer, sua diversidade e desenvolvimento, Hanahan e Weinberg (Hanahan e Weinberg, 2000) propuseram seis características ou *hallmarks* que permitem visualizar de forma esquemática a complexidade da doença neoplásica e as propriedades adquiridas pelas células durante a tumorigênese. Essas características incluem auto-suficiência em sinais de proliferação, resistência à morte celular, angiogênese sustentada, potencial replicativo ilimitado, invasão e metástase e insensibilidade a sinais supressores de crescimento.

Em função do grande número de dados de pesquisa sobre o câncer publicados nos últimos anos, Hanahan e Weinberg (Hanahan e Weinberg, 2011) atualizaram sua proposta em 2011 e acrescentaram duas outras características envolvidas na patogênese de muitos ou de todos os tumores. Uma delas é a capacidade de reprogramar o metabolismo celular para suportar de modo eficiente a proliferação. A outra diz respeito à capacidade de evasão ao ataque imunológico. Além dessas, foram propostas duas outras características que facilitam a aquisição dos *hallmarks* principais: a instabilidade genômica e, portanto, a mutabilidade que garante à célula com alterações genéticas seguir o processo neoplásico, e a inflamação sustentada principalmente pelas células do sistema imune inato, que promove as demais características.

Os autores reforçaram com sua análise a importância das interações entre a célula neoplásica e seu microambiente, cruciais para o fenótipo tumoral. Realmente, além das próprias células, estão presentes no microambiente da maioria das neoplasias sólidas diferentes tipos celulares que auxiliam o tumor a sobreviver, invadir e colonizar outros tecidos normais próximos e distantes. Entre eles, estão células-tronco com capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares especializadas, fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias. A abundância, a organização histológica e as características fenotípicas das células do estroma, bem como da matriz extracelular, modificam-

se durante a progressão neoplásica e, portanto, não são as mesmas de um estroma do tecido não neoplásico correspondente (Hanahan e Weinberg, 2011).

A ação contínua de diferentes fatores, como erros na replicação, agentes mutagênicos e carcinogênicos e alguns tipos de vírus que alteram o DNA e o ciclo de vida celular, pode transformar uma célula fenotipicamente normal em uma célula tumoral. As etapas da progressão neoplásica decorrente dessa instabilidade genômica incluem geralmente a aquisição de características de migração e invasividade e levam à doença metastática, um dos principais fatores responsáveis pelas mortes relacionadas ao câncer (Fouad e Aanei, 2017). Na etapa de metastatização ou colonização de tecidos distantes da lesão primária, a célula neoplásica além de motilidade e capacidade de invadir a matriz extracelular precisa adquirir a capacidade de entrar e sobreviver na circulação sanguínea ou linfática, extravasar, invadir outros tecidos e colonizá-los com sucesso (Steeg, 2006).

Estímulos intra e extracelulares, como vias de sinalização geradas por citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, possibilitam que células epiteliais, imóveis e aderentesumas às outras regulem negativamente suas características epiteliais e adquiram características mesenquimais, permitindo sua locomoção, invasão e metástase. O processo pelo qual células epiteliais adquirem características mesenquimais é denominado transição epitelio-mesenquimal (geralmente referida pela sigla EMT do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), e é tão importante para as fases iniciais da formação de metástases quanto seu processo inverso (transição mesênquima-epitelial/MET) é importante para a fase final de colonização de outros tecidos (Fouad e Aanei, 2017).

TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT)

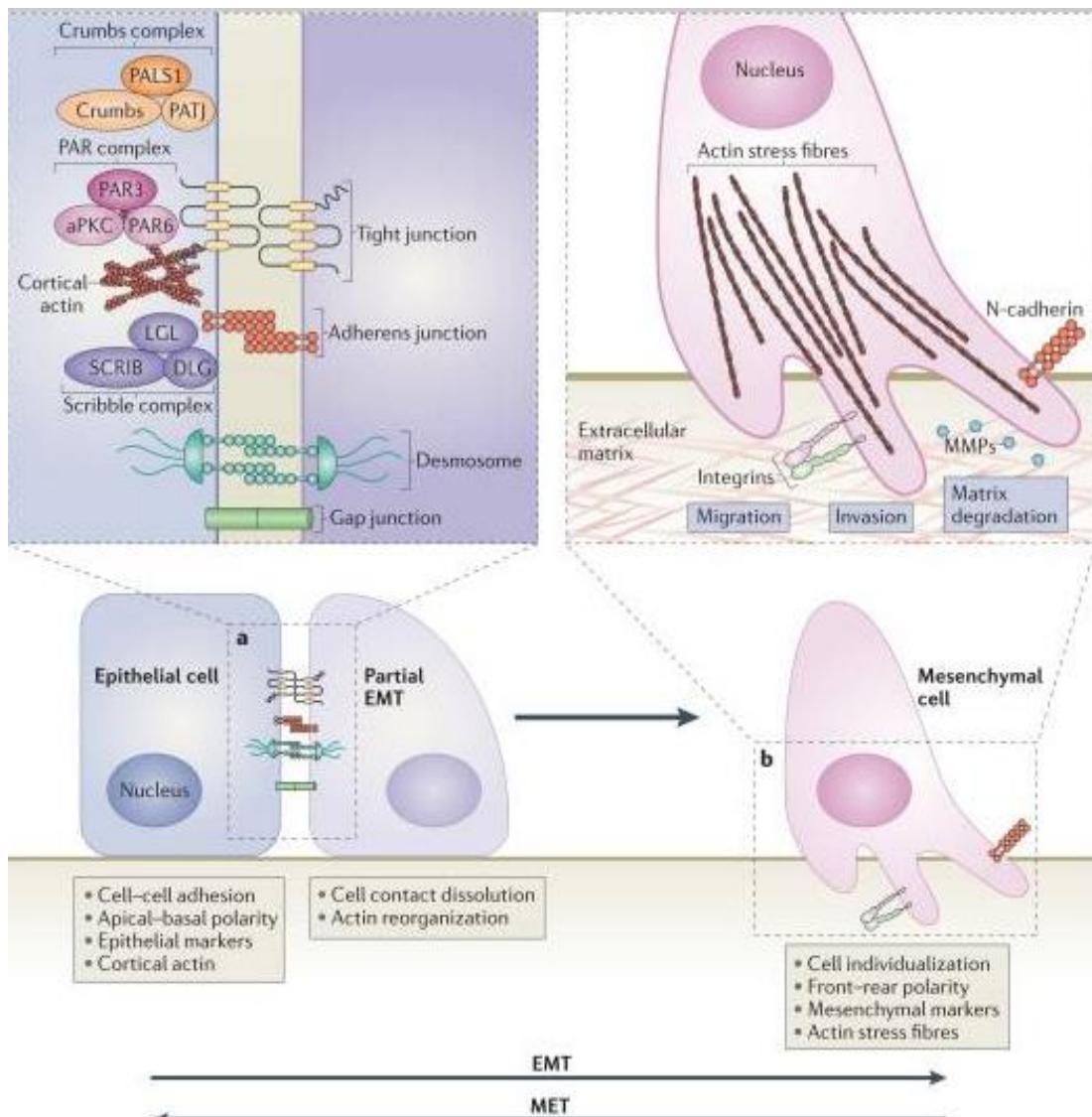
A transição epitelio-mesenquimal é um importante programa de desenvolvimento embrionário também relacionado com invasão e metástase em câncer, durante o qual as células perdem algumas características epiteliais e adquirem características mesenquimais. As células epiteliais possuem polaridade apical-basal, aderência célula-célula e à membrana basal, bem como comunicação através de junções intercelulares, o que difere das características de uma célula mesenquimal, que incluem motilidade e em muitos casos

capacidade de degradar matriz extracelular e invasão tecidual. O processo de EMT resulta em mudanças na organização do citoesqueleto e na morfologia celular, dissolução das junções célula-célula e aquisição de motilidade e habilidade em degradar e reorganizar a matriz-extracelular por meio de enzimas proteolíticas (matriz metaloproteinases/MMPs), o que facilita a angiogênese peritumoral e a invasão de estruturas adjacentes. Durante a EMT, ocorre redução de expressão de proteínas relacionadas com as características epiteliais, como a molécula de adesão E-caderina, e ativação das que auxiliam a definir o caráter mesenquimal, como a vimentina (Taube *et al.*, 2010; Graves *et al.*, 2014).

O início do processo de EMT se dá pela dissolução das junções celulares – junções aderentes, desmossomos, junções gap - com realocação ou degradação dos complexos moleculares responsáveis pela adesão célula-célula: PAR (formado pelas proteínas *partitioning defective* Par-3 and Par-6, and pela quinase atípica C aPKC), Crumbs (formado pela proteína transmembrânica Crumbs e pelos adaptadores PALS1 e PATJ) e Scribble (formado pelas proteínas Scribble, *discs large/DLG* and *lethal giant larvae/LGL*). Durante a dissolução das junções celulares, a E-caderina é clivada na membrana plasmática e degradada por metaloproteinases. Consequentemente, ocorre ruptura dos complexos Crumbs, PAR e Scribble, e perda de polaridade apical-basal. Em seguida, mudanças no citoesqueleto, como reorganização do arcabouço de actina, formação de lamelipódios, filopódios e invadopódios, conferem às células mobilidade, morfologia mais alongada e expressão de metaloproteinases, que podem degradar proteínas da matriz extracelular (ECM) conferindo também capacidade invasiva às células. As integrinas auxiliam na interação da célula com as proteínas da matriz extracelular, recém-remodelada, levando ao aumento da capacidade migratória (Figura 1) (Lamouille *et al.*, 2014).

Diversas vias de sinalização têm sido associadas à fase de iniciação da EMT, entre elas as vias TGF-beta-SMAD, Wnt, PI3K-AKT e JAK-STAT. Essas vias regulam a ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes como E-caderina e vimentina (Lamouille *et al.*, 2014). Estas vias e os fatores de transcrição relacionados serão detalhados mais a frente quando relacionados com o processo neoplásico.

Figura 1. Transição epitelio-mesenquimal (EMT). (a) Dissolução das junções epiteliais célula-célula, perda da polaridade apical-basal, diminuição da expressão de marcadores epiteliais. (b) Aquisição polaridade específica para o padrão migratório, reorganização da arquitetura do citoesqueleto, aumento de protusões e motilidade celular, capacidade de degradar matriz extracelular e invadir tecidos, e aumento da expressão de marcadores de caráter mesenquimal. A EMT parcial ocorre quando as células começam a perder contato umas com as outras e a



actina inicia sua reorganização. A transição mesênquima-epitelial (MET), na qual células com características mesenquimais voltam a apresentar características epiteliais, também pode ocorrer durante a colonização de tecidos distantes por células neoplásicas. Figura reproduzida de (Lamouille *et al.*, 2014).

Segundo Kalluri e Weinberg (Kalluri e Weinberg, 2009), a transição epitélio-mesenquimal pode ser classificada em três tipos que, embora representem processos biológicos distintos, possuem um conjunto comum de elementos genéticos e bioquímicos. O tipo 1 é associado às etapas iniciais da embriogênese e à origem do mesênquima primário, e pode gerar o epitélio secundário via transição mesênquima-epitelial. A EMT associada a cicatrização, regeneração tecidual e fibrose pertence ao segundo tipo. O tipo 2 compreende eventos que usualmente resultam em fibroblastos e outras células envolvidas na reconstrução de tecidos após trauma e injúria inflamatória. Quando o insulto inflamatório não é removido ou atenuado, a EMT pode tornar-se persistente, gerando fibrose e eventualmente destruição do órgão afetado. O tipo 3 de EMT ocorre em células neoplásicas portadoras de alterações genéticas e epigenéticas e resulta em desfechos muito diferentes dos outros dois tipos. As células de um tumor que sofrem EMT podem invadir e metastatizar outros tecidos e levar assim o organismo à morte. Nesse tipo de EMT, algumas células retêm muitas das características epiteliais e adquirem traços mesenquimais, enquanto outras células perdem todos os sinais de sua origem epithelial e tornam-se completamente mesenquimais.

Durante a transição epitélio-mesenquimal, o padrão de expressão de mais de 400 genes (e de seus produtos) é alterado, incluindo a redução dos níveis de E-caderina e o aumento dos níveis de moléculas mesenquimais, vimentina e fibronectina. Como referido acima, tais alterações resultam em mudanças na organização do citoesqueleto e na morfologia celular, aquisição de motilidade e habilidade em degradar e reorganizar a matriz-extracelular, o que facilita a angiogênese peritumoral e a invasão de estruturas adjacentes (Taube *et al.*, 2010; Graves *et al.*, 2014).

A diversidade fenotípica tumoral permite um processo de EMT parcial, no qual as células neoplásicas apresentam níveis diferentes de ativação de EMT dependendo de sua localização no tumor. Por exemplo, células neoplásicas próximas à superfície do tumor possuem maior redução de expressão de E-caderina que as células localizadas mais internamente. As células da superfície tumoral apresentam a EMT completamente ativada, com perda de adesão, capacidade de degradação da matriz extracelular e mobilidade, e maior probabilidade de migrar do tumor primário e entrar nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Aquelas que tiverem sucesso na extravasão e sobreviverem em

tecidos diferentes dos tecidos de origem podem ativar o processo de transição mesênquima-epitelial e colonizar outro órgão (Figura 2) (Shibue e Weinberg, 2017).

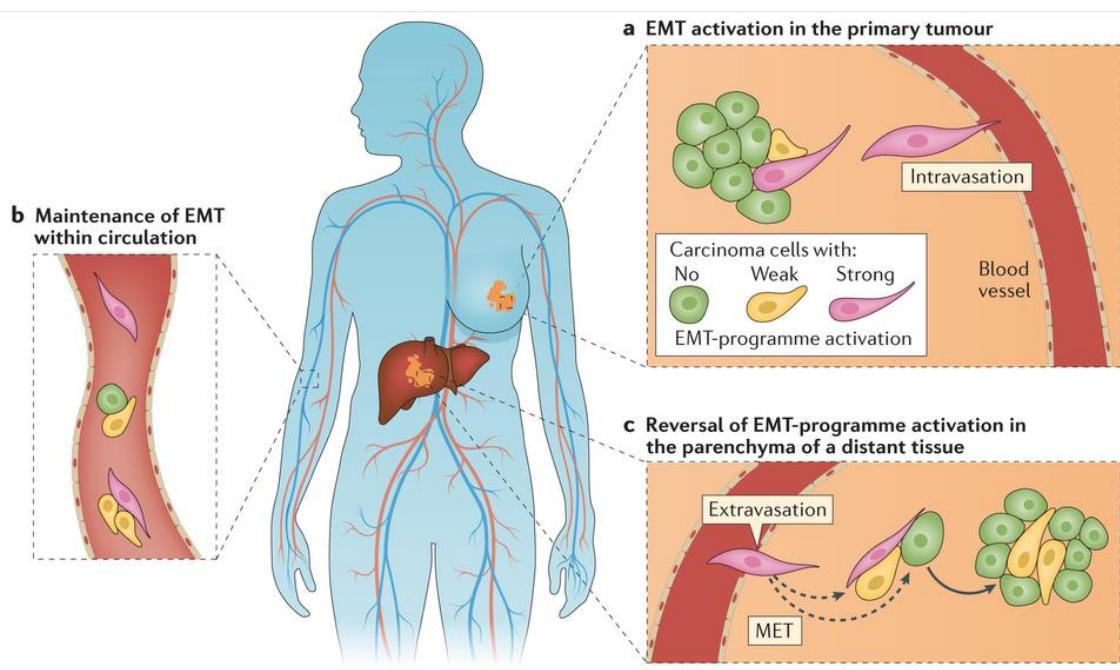


Figura 2. EMT e progressão neoplásica. (a) A ativação de EMT em tumores primários permite mobilidade, invasão e entrada na circulação. (b) Durante a circulação na corrente sanguínea, podem ser observadas células em diferentes estágios de EMT. (c). A ativação de MET no parênquima de um tecido distante do órgão de origem é etapa importante para o crescimento da metástase. Figura reproduzida de (Shibue e Weinberg, 2017).

A indução de EMT tem sido associada a vários estímulos extracelulares ligados a vias de sinalização intracelulares, incluindo aqueles procedentes de células estromais envolvidas em respostas inflamatórias. Como referido acima, estas vias incluem as de TGF-beta/SMAD, Wnt, PI3K/AKT e JAK/STAT e culminam na ativação de programas transcripcionais responsáveis por alterações de expressão gênica. O grupo relativamente pequeno de fatores de transcrição diretamente envolvidos em EMT compreende basicamente três famílias – proteínas com motivos dedo de zinco SNAIL, homeoboxes com motivos dedo de zinco ligador de E-box ZEB e fatores de transcrição com motivo hélice-volta-hélice TWIST e TCF-3, codificados respectivamente pelos genes *SNAI*s, *ZEB*s e *TWIST*s ou *TCF3*. Esses fatores de transcrição possuem um perfil de expressão variável e sua contribuição para EMT está subordinada ao tipo de célula envolvida e à presença de ligantes ou alterações que ativam vias de sinalização (Dongre e Weinberg, 2019).

A via Wnt, por exemplo, é iniciada pela ligação do ligante Wnt a receptores de membrana da família Frizzled, o que leva à liberação da proteína beta-catenina do complexo GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) – AXIN (*axis inhibition protein*) – APC (*adenomatous polyposis coli protein*). A beta-catenina livre transloca-se para o núcleo, onde se liga aos fatores de transcrição TCF (*T cell factor*) e LEF (*lymphoid enhancer-binding factor*) para ativar genes que regulam EMT. A via Wnt interage com a via NOTCH, que é iniciada pela indução de clivagem e acúmulo do domínio intracelular do receptor NOTCH (NOTCH-ICD) pelos ligantes delta-like ou Jagged-1. Na via TGF-beta, a fosforilação do receptor pelo ligante resulta na ativação dos moduladores de transcrição SMAD, que também interagem com a via Wnt por meio de NOTCH-ICD. A via PI3K-AKT, por sua vez, desencadeia sinais para a proteína alvo da rapamicina mTOR, para o fator de transcrição nuclear kappa B (NFKB) e para a via RAS-RAF-MEK-ERK. A sinalização para EMT também pode ter início pela ligação de citocinas aos seus receptores, e tem continuidade pela fosforilação das quinases JAK e dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição STATs (Figura 3) (Jolly *et al.*, 2014; Pattabiraman e Weinberg, 2014; Shibue e Weinberg, 2017; Dongre e Weinberg, 2019).

Em linhagens celulares, os níveis de EMT são intrinsecamente variáveis sob condições de cultura basais, podendo ser elevados por hipoxia (Gammon *et al.*, 2013) e por citocinas e quimiocinas secretadas durante o processo inflamatório, como será discutido no próximo item.

Vários estudos têm correlacionado a presença de marcadores EMT com pior prognóstico em diversos tipos de câncer em função da resistência a diversos quimioterápicos e imunoterapia (Dongre e Weinberg, 2019), fato que caracteriza ainda mais a importância do estudo da EMT e sua relação com estímulos extra e intracelulares.

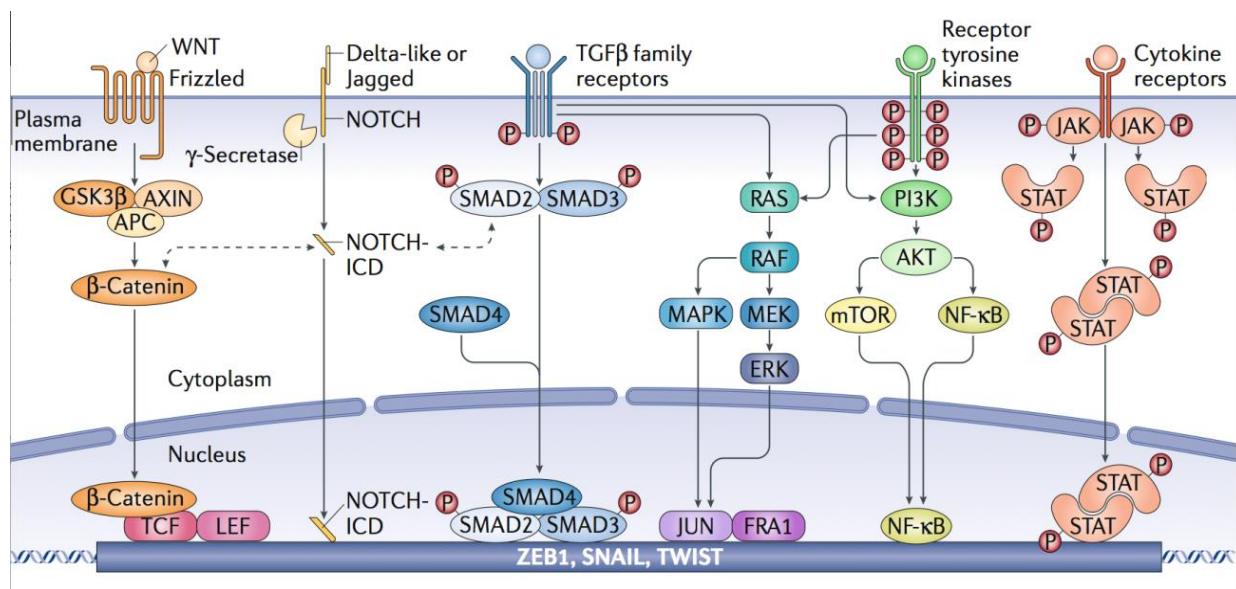


Figura 3. Vias de sinalização que induzem o processo de EMT. As vias têm início em receptores de membrana (Frizzled, NOTCH, receptores tirosina quinases e receptores de citocinas) ativados por ligantes (WNT, Delta-like, Jagged, TGF-beta e citocinas), que desencadeiam sinais para EMT por efetores secundários (GSK3B, Axin, APC, beta-catenina, NOTCH via domínio intracelular ICD, SMADs, RAS, RAF, MAPK, MEK, ERK, PI3K-AKT, mTOR, NFkB e STATs) e por fatores de transcrição (TCF, LEF, NOTCH-ICD, SMADs, JUN, FRA1, NFkB e STATs) responsáveis pela expressão de ZEB1, SNAIL e TWIST. Reproduzida de (Donge e Weinberg, 2019).

INFLAMAÇÃO E CÂNCER

A primeira associação entre inflamação e câncer foi referida pelo médico alemão Rudolf Virchow no século XIX, que descreveu infiltrados de leucócitos em tumores (Balkwill e Mantovani, 2001). A idéia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é apoiada pela observação de que o câncer surge freqüentemente em áreas de inflamação crônica. Realmente, a inflamação causada pela infecção por bactérias e vírus aumenta o risco de câncer (De Martel e Franceschi, 2009) e alguns exemplos são bem conhecidos, como as infecções pelo papilomavírus humano (HPV) em câncer de colo de útero (Lee *et al.*, 2011) e pela bactéria *Helicobacter pilori* em câncer gástrico (Crowe, 2005).

A relação inflamação e câncer tem sido amplamente estudada, bem como sua relevância nas taxas de sucesso ou resistência à terapia. Confirmando esta relação, estão os índices de 15 a 20% de mortes por câncer no mundo ligadas a infecção e a respostas inflamatórias (Mantovani *et al.*, 2008). Esses dados foram responsáveis pela inclusão no *hallmarks* do câncer atualizados por Hanahan e Weinberg de dois traços que levam em conta a inflamação - o ambiente inflamatório e a evasão ao ataque imune (Hanahan e Weinberg, 2011).

No início da tumorigênese, as células inflamatórias e os fatores que elas produzem promovem um ambiente que facilita a instabilidade genômica, levando a eventos mutacionais e epigenéticos (Ronnov-Jessen e Petersen, 1996). As células transformadas utilizam mecanismos inflamatórios para invasão de outros tecidos, como por exemplo, adesão de células à parede de vasos e migração ou diapedese por entre as células endoteliais, o que torna os processos de inflamação e metastatização muito similares, um fato destacado por Perretti em 1997 (Perretti, 1997).

Os fatores secretados pelas células inflamatórias - neutrófilos, linfócitos, macrófagos - incluem numerosas citocinas (por exemplo, TNF- α , TGF-beta, interleucinas IL-1 e IL-6), fatores de crescimento e quimiocinas (como CCL18 e interleucina IL-8) que estimulam a proliferação e a diferenciação, inibem a apoptose, induzem EMT e geram espécies reativas de oxigênio que podem lesar o DNA (Figura 4) (Coussens e Werb, 2002; Seruga *et al.*, 2008; Jones e Jenkins, 2018; Berraondo *et al.*, 2019).

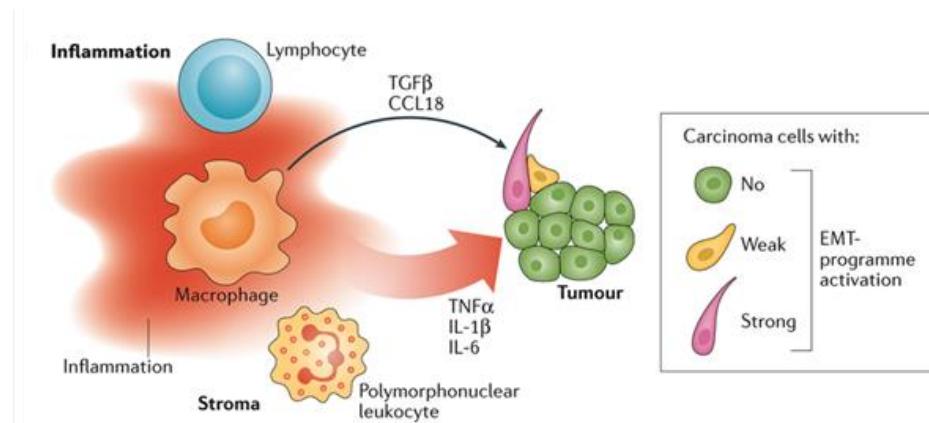


Figura 4. Contribuição da inflamação para indução de EMT. Nos locais de inflamação crônica presentes no microambiente tumoral, as células inflamatórias liberam citocinas e quimiocinas que contribuem para a indução de EMT nas células neoplásicas. Figura reproduzida de (Shibue e Weinberg, 2017).

A indução de EMT pela inflamação é realizada por meio da regulação uma rede intrincada de efetores e fatores de transcrição (Jiang *et al.*, 2011; Esquivel-Velazquez *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2015; Ortiz-Montero *et al.*, 2017; Shibue e Weinberg, 2017) que, segundo Mantovani e cols. (2008), pode ser interpretada como tendo dois tipos de via: (a) a extrínseca, determinada por processos inflamatórios desencadeados por agentes externos, e (b) a intrínseca, iniciada por alterações genéticas em oncogenes e supressores de tumor. Os dois tipos de via convergem resultando geralmente na ativação de NFKB, STAT3 e do fator induzível por hipóxia HIF1-alfa, e no recrutamento de leucócitos, que desencadeiam cascatas de sinais inflamatórios em células estromais, neoplásicas e do sistema imune. O resultado é um quadro amplo de inflamação no microambiente tumoral com consequente proliferação celular, indução de EMT, angiogênese e resposta imune (Mantovani *et al.*, 2008).

Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória clássica produzida por diversos tipos celulares. Em condições neoplásicas, é encontrada com expressão elevada, o que está relacionado com inibição de resposta imune, indução de EMT e pior prognóstico em diversos tipos de câncer. Essa citocina tem um papel importante na modificação do comportamento de vários tumores incluindo proliferação, sobrevivência, angiogênese, migração, invasão e metástase (Yadav *et al.*, 2011; Ataie-Kachoie *et al.*, 2014; Taher *et al.*, 2018). Quando ligada a seu receptor de membrana IL-6R acoplado ao receptor gp130, pode levar à ativação de três vias de sinais - JAK/STAT, PI3K/AKT e Ras/MAPK - que são importantes em condições fisiológicas normais para indução de crescimento celular, diferenciação e sobrevivência. Dentre as três, a via de sinalização mais utilizada pela IL-6 é a da JAK/STAT (Ataie-Kachoie *et al.*, 2014). Nessa via, a ligação de IL-6 ao receptor IL-6R/gp130 induz a fosforilação de JAK que, por sua vez, fosforila e ativa STAT3. O STAT3 é então translocado para o núcleo e regula a expressão de vários genes que induzem EMT, suprimindo a expressão de E-caderina e induzindo as de vimentina, SNAILs e TWIST. A via IL-6/JAK/STAT mostra conexão com a do fator de crescimento epidérmico EGF (Figura 5) (Ataie-Kachoie *et al.*, 2014; Taher *et al.*, 2018).

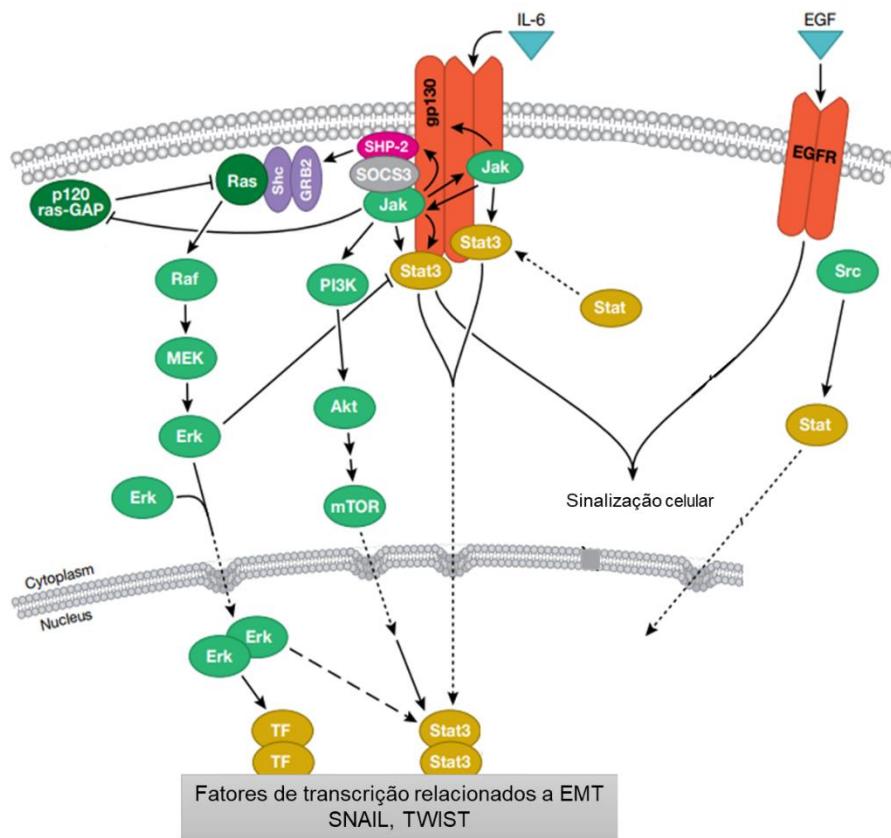


Figura 5. Via JAK/STAT, PI3K/AKT e Ras/MAPK ativadas por IL-6. A via mais utilizada pela IL-6 é a de JAK, que leva à fosforilação do fator de transcrição STAT3, e posteriormente à expressão de genes responsáveis por EMT em diversos tipos celulares, principalmente em células tumorais. Figura modificada de (Technology, 2018a).

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Quando descoberto em 1975, o TNF- α foi descrito como uma endotoxina do soro que seria responsável por necrose das células tumorais. Entretanto, no decorrer dos anos, foi observada sua expressão crônica no microambiente tumoral e seu papel como mediador de inflamação, EMT, angiogênese e proliferação (Balkwill, 2009). Os dados da literatura também têm evidenciado sua característica antagônica, ora tendo um papel anti-inflamatório em diversas doenças e outras vezes tendo um papel pró-inflamatório. Sua deficiência pode resultar em inflamação crônica e, em níveis elevados, causar choque séptico (Balkwill, 2009). Na maioria dos tumores, é observado com concentrações altas no microambiente e relacionado à progressão tumoral (Wu e Zhou, 2010).

Existem dois receptores para o TNF- α : (a) o TNFR1, que é encontrado na maioria das células do corpo humano e cuja sinalização utiliza os efetores TRADD (*TNFR1-associated DEATH domain protein*), além das proteínas FADD e RIP, (b) e o TNFR2, expresso apenas em células endoteliais e do sistema

imune e cujos sinais seguem por I-TRAF/RIP ou pelas quinases MEKK. A ativação do TNFR1 pode levar a dois resultados diferentes que dependem do contexto celular: uma via induz inflamação e sobrevida e outra induz apoptose (Figura 6) (Balkwill, 2009). O efeito anti-inflamatório com indução de apoptose ocorre pela ativação de caspases e o efeito pró-inflamatório e de sobrevida pela ativação de RIP/NFKB, RIP/MAP quinase quinase 3 (MKK3) ou MEKK. Em quase todos os tipos celulares, a exposição a TNF-a está ligada à via do NFKB, que leva à expressão de genes pró-inflamatórios. Quando a ativação de NFKB não ocorre de maneira adequada, as caspases são acionadas e é gerada uma resposta tardia ao TNF-a (Balkwill, 2009).

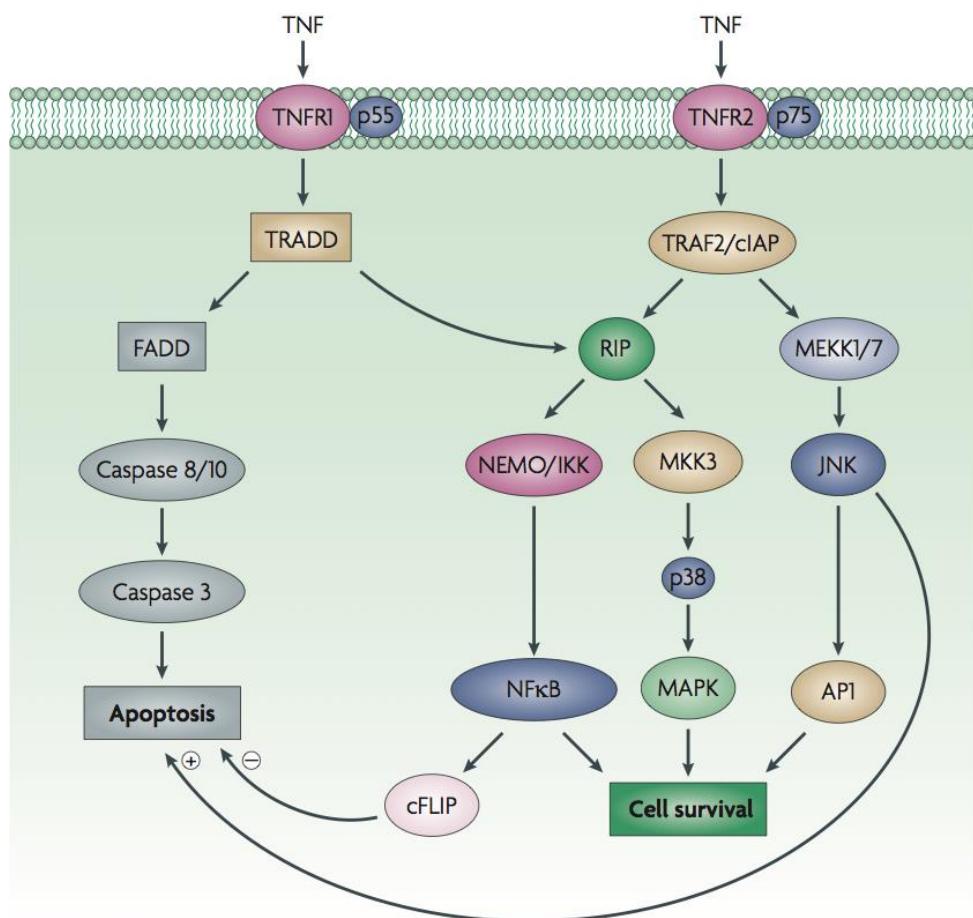


Figura 6. Vias de sinalização ativadas pela TNF- α . O receptor TNFR1 ativa TRADD, que pode induzir apoptose pela ativação de FADD e caspases 8/10 e 3 ou induzir sobrevida pela ativação de RIP/NFKB ou RIP/MKK3. O NFKB também possui uma regulação negativa da apoptose via cFLIP (*CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*). O receptor TNFR2, expresso apenas em células endoteliais e do sistema imune, ativa a via do MEKK1/7 responsável pela sobrevida e pela regulação positiva da apoptose (Faustman e Davis, 2010).

O TNF-a induz EMT pela ativação da quinase AKT que estimula NFKB resultando na elevação de expressão de SNAIL e na inibição de E-caderina (Wu e Zhou, 2010). O TNF-a é sintetizado por células neoplásicas e por células estromais e sua presença no microambiente é associada a prognóstico sombrio (Wu e Zhou, 2010).

O tratamento de células de carcinoma colorretal com TNF-a é seguido de ativação de NFKB e leva à progressão de EMT em decorrência do aumento de expressão dos fatores de transcrição SNAIL e ZEB1 e ZEB2 (Shen *et al.*, 2017). Células de carcinoma de hipofaringe tratadas com TNF-a exibiram alteração de morfologia e aumento de migração e invasão celular, além de redução de expressão de E-caderina e aumento de vimentina e N-caderina, bem como de NFKB e TWIST, o que indica indução de EMT (Yu *et al.*, 2014).

Fator de crescimento transformante beta (TGF-beta)

O TGF-beta atua de duas maneiras antagônicas no desenvolvimento e na progressão tumoral. Pode manifestar um papel de supressor tumoral ou como promotor de EMT e metástase. A explicação para esse fato está na própria célula tumoral, que é capaz de alterar as vias do TGF-beta de modo que o sinal de supressão seja inibido e os de crescimento tumoral, invasão, migração e metastatização sejam induzidos (Huang e Blobe, 2016). A elevação dos níveis de TGF-beta no microambiente tumoral também estimula a inflamação que, por sua vez, favorece EMT e progressão neoplásica. Existem mais de 30 ligantes da família TGF-beta, os TGF-beta propriamente ditos e as proteínas BMP (*bone morphogenetic proteins*) entre outros (Neuzillet *et al.*, 2015).

A indução de EMT pelos ligantes TGF-beta ocorre por diversas vias, sendo a via SMAD a mais utilizada. Nessa via, a ligação de TGF-beta aos receptores TGF-beta-R1 e R2 promove a fosforilação da SMAD2 e 3, que formam um complexo com SMAD4. Por outro lado, a ligação de BMPs (BMP2, 4 ou 7) aos mesmos receptores resulta na fosforilação de SMAD1, 5, 9, que também formam um complexo com SMAD4. Os complexos SMAD migram para o núcleo e regulam a expressão de vários fatores de transcrição (Figura 7) (Lamouille *et al.*, 2014; Dongre e Weinberg, 2019).

Em vias independentes de SMAD, os sinais de TGF-beta seguem por PI3K/Akt, Rho GTPases e efetores de espécies reativas de oxigênio (Heldin e Moustakas, 2016; Dongre e Weinberg, 2019). O TGF-beta também utiliza outras

redes metabólicas envolvidas no controle de proliferação e motilidade celular, como Ras (Vasilaki *et al.*, 2016) e p53 (Lam *et al.*, 2014).

Tanto a via dependente como a via independente de SMAD induzem o aumento de expressão de fatores de transcrição relacionados com a indução de características mesenquimais e com a inibição características epiteliais, como MMPs e IL-6, promovendo assim a progressão tumoral (Xu *et al.*, 2009). Em linhagens celulares de diversos tipos de carcinoma, a combinação das duas vias SMAD dependentes dos ligantes TGF-betas e BMPs parece ser necessária para ativação da EMT (Ramachandran *et al.*, 2018)

O tratamento de linhagem de câncer cervical (HeLa) com a combinação de TNF-a e TGF-beta ativa a EMT pelo aumento de expressão de *NFKB* e *TWIST* (Dong *et al.*, 2017), o que foi confirmado por Li e col. (2017) (Li *et al.*, 2017), que observaram a integração das vias TGF-beta/SNAIL e TNF-a/NFkB no processo de EMT e como marcador de prognóstico desfavorável em câncer colorretal. Em tumores de mama, o tratamento combinado com IL-6, TNF-a e TGF-beta resultou de forma similar em progressão de EMT, com diminuição de expressão do gene *CDH1* e aumento de expressão de *ZEB1*, *NFKB*, *SNAI2*, *FN1* (Cohen *et al.*, 2015).

In vivo, o TNF-a e o TGF-beta foram observados em maior concentração em saliva e soro de pacientes com carcinoma de orofaringe, o que reforça a participação conjunta dessas citocinas na tumorigênese e seu papel como possíveis marcadores tumorais (Polz-Dacewicz *et al.*, 2016).

Dos dados acima, fica evidente a importância da inflamação no processo neoplásico e das citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF- α e TGF-beta. Apesar disso, são poucas as informações sobre inflamações no contexto de condições infecciosas, como ocorre, por exemplo, em carcinomas de cabeça e pescoço associados a HPV.

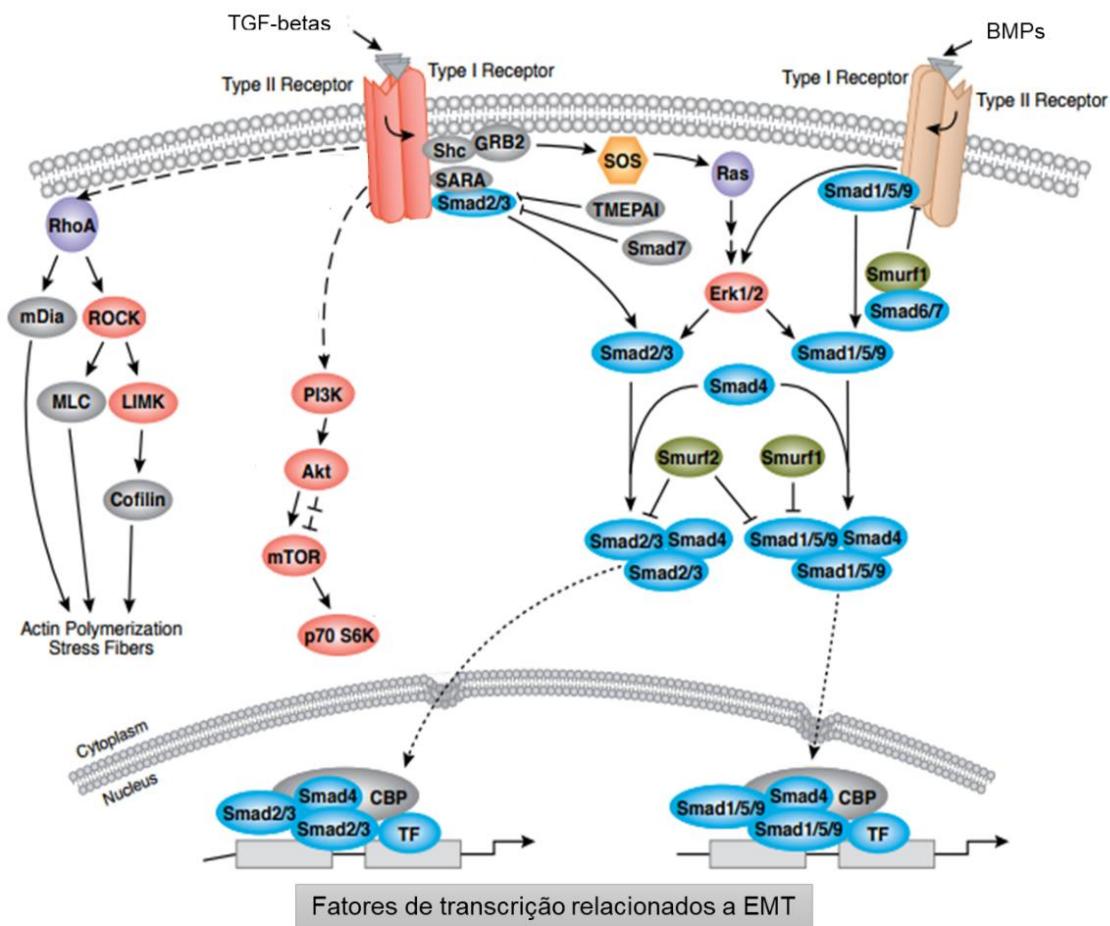


Figura 7. Vias de sinalização induzidas pela família TGF-beta. Nas vias dependentes de SMAD, tanto a ligação de TGF-beta como a ligação de BMPs aos receptores TGF-beta-R1 e R2 resulta na formação dos complexos SMAD2/3 com SMAD4 e SMAD1/5/9 com SMAD4, respectivamente. A ligação de TGF-beta ao receptor pode induzir vias independentes de SMAD, como PI3K/Akt e Rho GTPases. Tanto a via dependente como a via independente induzem o aumento de expressão de fatores de transcrição relacionados a EMT. Figura modificada de (Technology, 2018b).

CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO

Os tumores de cabeça e pescoço compreendem processos neoplásicos que ocorrem no trato aéreo-digestivo superior, incluindo cavidade oral, faringe e laringe. O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas ou epidermóide (CECP). Esses carcinomas são heterogêneos e resultam do acúmulo de mutações somáticas em genes que regulam o crescimento, a proliferação e a morte celular, consequentemente levando a alterações na função de seus produtos. Existem muitas evidências de que também resultam de mudanças epigenéticas responsáveis por alterações no padrão de expressão gênica da

célula. Esses eventos geralmente conferem vantagens adaptativas à célula e aquisição de um fenótipo maligno (Leemans *et al.*, 2011).

É estimada uma incidência anual de aproximadamente 600 mil novos casos de CECP no mundo (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, as estimativas para o ano de 2018 apontaram aproximadamente 23 mil novos casos somente na cavidade oral e na laringe (Inca, 2017).

Embora a origem desse grupo de doenças seja multifatorial, há uma forte associação com o abuso de tabaco e álcool (Franco *et al.*, 1989; Lichtenstein *et al.*, 2000), o que é evidenciado pelo aumento de incidência em populações em que esses hábitos são comuns (Ho *et al.*, 2006). Na literatura, também há indicação do envolvimento do papilomavírus humano (HPV) na etiologia dos CECPs (Schwartz *et al.*, 1998; Iarc, 2007), em especial nos de orofaringe (Herrero *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2014). Syrjanen e col. (1983) foram os primeiros a propor esta associação tanto para a carcinogênese de orofaringe como oral (Syrjanen *et al.*, 1983).

Os carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço (CECP) compreendem um dos melhores exemplos de neoplasmas que ocorrem em um contexto de inflamação. Aproximadamente todos os componentes do sistema imune inato são afetados pelo consumo de álcool crônico ou agudo e, embora a exposição aguda induza o aumento de níveis de citocinas anti-inflamatórias, esta resposta não é suficiente para contrabalançar a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias no seu consumo crônico (Szabo e Saha, 2015).

Além de sua incidência, os CECPs são clinicamente importantes porque possuem taxas elevadas de morbidade e mortalidade (Ferlay *et al.*, 2015). O índice geral de sobrevida em 5 anos está entre os mais baixos quando comparado a outros tipos de câncer (Dasgupta *et al.*, 2006). Realmente, mesmo com a utilização de opções terapêuticas como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, aproximadamente 50% dos pacientes acometidos pela doença morrem. Nos casos diagnosticados com tumores em estágios avançados ou com recidiva, o câncer de cabeça e pescoço é quase sempre fatal, com uma sobrevida média de aproximadamente seis meses (Barbosa Lnf, 2004; Weber *et al.*, 2007).

As limitadas opções terapêuticas para estágios avançados do câncer de cabeça e pescoço tornam necessária a melhoria no entendimento das bases moleculares relacionadas com início, progressão e disseminação da doença.

Leemans e col (2018) (Leemans *et al.*, 2018), em uma revisão sobre as bases moleculares dos tumores de cabeça e pescoço, resumiram os dados de sequenciamento disponíveis no TCGA (The Cancer Genome Atlas) de 279 pacientes com CECP, incluindo casos HPV negativos e positivos. Esses autores observaram que, embora os dados já tenham sido analisados e publicados, existem mais de 500 casos disponíveis no TCGA que podem ser estudados, ou seja, muitos detalhes sobre as vias envolvidas na tumorigênese de cabeça e pescoço e sobre o papel do HPV estão ainda por serem esclarecidos (Leemans *et al.*, 2018).

Um grande número de estudos tem identificado genes de câncer estabelecidos ou candidatos em CECP, entre eles *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *NOTCH* e *PIK3CA* (Dotto e Rustgi, 2016). O perfil mutacional varia entre os casos HPV negativos com e sem alta instabilidade cromossômica e os casos HPV positivos (Leemans *et al.*, 2011; Leemans *et al.*, 2018). Entre esses últimos, o sítio de integração do vírus em regiões promotoras ou exônicas pode resultar em expressão elevada do gene vizinho, como tem sido demonstrado para *c-MYC*, *ERBB2* e *TP63*, enquanto a integração em regiões intrônicas resulta, em média, a uma baixa expressão, como ocorre para os genes *RAD51B*, *FANCC*, *FHIT* e *LRP1B* (Tuna e Amos, 2017).

Os dados da literatura também têm revelado alterações de expressão de marcadores classicamente associados com EMT. Por exemplo, Kandoth e cols (2013) observaram mutações em genes da via do TGF-beta em cerca de 10% dos casos (Kandoth *et al.*, 2013). O estudo também referiu mutações no gene da histona acetiltransferase EP300 e confirmou mutações em *NOTCH1*, ambos ligados à EMT como ativadores chave de E-caderina e HIF1, respectivamente, e também a jusante da via de SNAIL no caso de *NOTCH1*.

Pacientes com CECP apresentam alterações significativas em células imunocompetentes e no padrão de secreção de citocinas e quimiocinas. Durante o processo neoplásico, tem sido observado acúmulo de células reguladoras T (Tregs) em linfonodos e de outras células do sistema immune (T convencional, T helper e T citotóxicas 1), indicando uma resposta antitumor benéfica. Em estágios mais avançados, essa resposta fica prejudicada em função do número reduzido de linfócitos, de mudanças nas proporções das várias populações de células T, na maturação e no tipo de secreção de células dendríticas e no aumento do número de macrófagos associados ao tumor. A produção de mediadores solúveis

da resposta imune (VEGF/*vascular endothelial growth factor*, prostaglandina E2/PGE2, TGF-beta, IL-6 e IL-10) apresenta-se igualmente alterada (Varilla *et al.*, 2013).

Devido ao aumento dos casos de CECP relacionados à infecção por HPV, é importante investigar mais especificamente a relação desta infecção com inflamação e EMT nesses tumores.

PAPILOMÁVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus compreendem um grupo heterogêneo que infecta o tecido epitelial de mamíferos, aves e répteis e que, em função de sua importância médica, tem sido bastante estudado (Doorbar, 2005). A infecção por papilomavírus humano é muito comum e, em alguns casos, está associada a câncer. Em várias populações, mais de 50% das mulheres (até 80%) e homens sexualmente ativos são infectados por HPV em algum momento da vida (Einstein *et al.*, 2009).

Existem mais de 150 HPVs geneticamente distintos, sendo numerados de acordo com a ordem de descoberta (De Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010). Os HPVs da família *Papillomaviridae* do gênero *Alphapapillomavirus* infectam preferencialmente a mucosa do trato anogenital e do trato aerodigestivo e diferentes subsítios da cabeça e pescoço, como boca e orofaringe, enquanto os *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus* infectam preferencialmente a pele de humanos (Doorbar, 2005; Fauquet e Stanley, 2005). O gênero *Alphapapillomavirus* possui um subgrupo no qual se encontram os vírus de alto potencial oncogênico, como HPV 16 e 18 (Doorbar, 2005).

O HPV é um vírus icosaédrico não envelopado de 50-60 nm de diâmetro, com genoma de DNA fita dupla circular de aproximadamente 8000 pares de bases, que se replica no núcleo da célula hospedeira e causa lesões hiperproliferativas no epitélio estratificado (Bernard *et al.*, 2010). O genoma viral contém oito sequências abertas de leitura (ORFs, do inglês *open reading frames*), as quais codificam seis proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) associadas a transcrição e replicação de DNA (E1, E2), saída do novo vírus pela superfície epitelial (E4) e transformação celular (E5, E6 e E7), e duas tardias (L1 e L2), que transcrevem as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente

(Palefsky e Holly, 1995; Kumaraswamy e Vidhya, 2011; Doorbar *et al.*, 2015). A região LCR (*Long Control Region*), localizada entre o final de L1 e início de E6, regula a expressão viral, pois contém promotores, sítios de ligação para fatores de transcrição virais e celulares e origem da replicação viral. A heterogeneidade dessa região diferencia os vários tipos de HPV (Doorbar *et al.*, 2015).

O ciclo replicativo do HPV está fortemente ligado à diferenciação celular dos queratinócitos do hospedeiro. Sua entrada no corpo humano requer um ferimento que permita ao vírus penetrar nas camadas basais do epitélio (Syrjanen e Puranen, 2000) e infectar as células-tronco epiteliais (Doorbar, 2005). Após a infecção, o vírus se estabelece como um episomônio no núcleo, com baixo número de cópias. Nesse estágio, a replicação viral é considerada não produtiva, sendo as proteínas E1, E2, E6 e E7 expressas em níveis baixos e, consequentemente, não ocorrendo a formação de novos vírus (Rautava *et al.*, 2012). À medida que as células infectadas se diferenciam e atingem camadas superiores do epitélio, o vírus inicia a fase produtiva de seu ciclo de vida, caracterizada pela replicação do episomônio em mais de 1000 cópias por célula (Lehoux *et al.*, 2012). Os níveis de proteínas virais necessárias à replicação aumentam (E1, E2, E4, E5) e as proteínas do capsídeo (L1 e L2) são produzidas em células epiteliais mais maduras (Lehoux *et al.*, 2012).

A infecção por HPVs geralmente causa lesões epiteliais benignas, mas aquela causada por certos subtipos, tais como HPV 16, HPV 18 e HPV 31, está associada a um risco elevado de desenvolvimento de neoplasias, como a de colo de útero e de orofaringe. Esses HPVs são chamados por esse motivo de HPVs de alto risco (Doorbar *et al.*, 2015). A diferença entre os de baixo e alto risco está relacionada com as características das proteínas virais E6 e E7 (Doorbar *et al.*, 2015), sendo aquelas de HPVs de alto risco capazes de imortalizar culturas celulares humanas (Zur Hausen, 2002).

A integração do genoma do HPV no cromossomo da célula hospedeira representa um evento frequente durante a progressão maligna, que leva à expressão desregulada de E6/E7 em função da perda do repressor transcricional E2 (Jeon *et al.*, 1995). A proteína E6 liga-se à proteína supressora de tumor p53 e estimula sua degradação (Scheffner *et al.*, 1993). Essa ligação pode ser direta entre as duas proteínas ou depender da formação de um complexo E6AP, que inibe p53 (Moody e Laimins, 2010). A inibição de p53 facilita a replicação viral e, na presença de uma infecção persistente, aumenta a instabilidade genômica e,

consequentemente, o acúmulo de mutações causado pela ausência do efeito supressor de p53 em processos de proliferação, reparo de DNA e apoptose (Moody e Laimins, 2010). A E6 também inibe apoptose pela interação com o receptor de TNF-a, TNFR1, associado a FADD e caspase 8 e pela degradação das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK (Figura 8A) (Moody e Laimins, 2010).

A proteína E7 de alto risco liga-se à proteína pRB (Giarre *et al.*, 2001), um regulador negativo do ciclo celular (transição de G1-S) que modula a atividade de fatores de transcrição E2F e atua em processos de proliferação e manutenção da integridade do genoma e apoptose (Moody e Laimins, 2010). A E7 também contribui para imortalização celular e aumento de proliferação ligando-se a quinases dependentes de ciclina (CDKs) e aos inibidores de CDK - p21 e p27 (Figura 8B) (Moody e Laimins, 2010).

Na infecção por HPV, o DNA dupla fita do vírus é reconhecido pelos receptores PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) presentes em células do sistema imune do hospedeiro, que iniciam cascatas de sinalização e ativam a transcrição de genes antivirais, gerando interferons e citocinas. As proteínas E6/E7 de alto risco, por sua vez, inibem a sinalização PRR, bem como a via a jusante do NFKB. Apesar dos esforços virais para evasão das defesas do hospedeiro, quase todas as infecções são controladas, mas a regressão das lesões depende de respostas efetivas de células T que, infelizmente, são fracas e transitórias (Schiffman *et al.*, 2016).

O papel da mucosa do hospedeiro como barreira à infecção por HPV e na modulação da resposta imune não é completamente entendido. Apesar disso, não existem dúvidas de que proteínas, hormônios e metabólitos presentes na mucosa e em sua secreção e o microbiota local influenciem as respostas imunes inatas e adaptativas e a persistência bem como a progressão da infecção (Schiffman *et al.*, 2016).

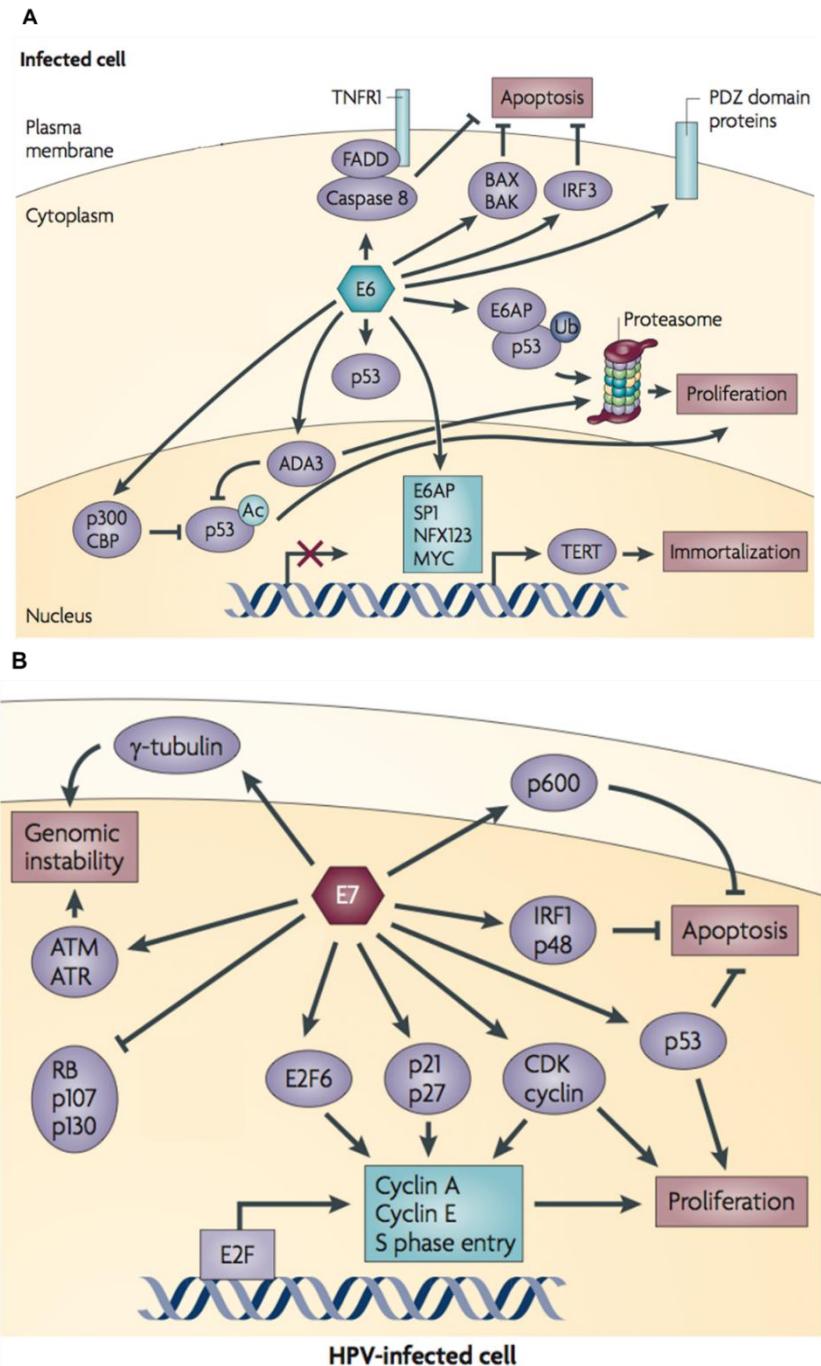


Figura 8. Atividade de E6 e E7 na infecção por HPV e seu potencial oncogênico. **A.** A proteína E6 de HPV de alto risco inibe p53 de maneira direta ou pelo complexo E6AP ou pela interação com o adaptador transcricional ADA3, com as acetiltransferases de histona p300 ou com a proteína ligadora de CREB (CBP). A E6 também inibe apoptose por meio da interação com TNFR1, FADD e caspase 8 e pela degradação das proteínas BAX e BAK. A interação de com E6AP, SPI1, MYC e NFX123 ativa a transcriptase TERT e a telomerase, promovendo a imortalização celular. Induz a degradação de PDZ, o que causa a perda de polaridade celular. **B.** A proteína E7 de HPV de alto risco regula o ciclo celular e aumenta a proliferação pela inibição de RB e ativação de fatores de transcrição E2F, inibidores de CDK (p21, p27), p53, ciclinas e CDK. Inibe morte celular por interação com p53 e com p600. Também interage com componentes da resposta a interferon (IRF1 e p48), contribuindo para o escape imune. A interação de E7 com γ -tubulina e ATM-ATR podeoccasionar acúmulo de alterações cromossômicas e aumento na instabilidade genômica. Figura modificada de (Moody e Laimins, 2010).

HPV e CECP

A incidência de CECP HPV positivos, que frequentemente acomete jovens, tem aumentado nos últimos anos em países da América do Sul e da Europa como já ocorreu nos Estados Unidos, e é uma consequência do comportamento sexual (Vokes *et al.*, 2015). Este aumento principalmente em sítios anatômicos como cavidade oral e orofaringe é resultado da prática de sexo oral e do número elevado parceiros, um comportamento que intensifica a chance de infecção e de desenvolvimento tumoral (Vokes *et al.*, 2015; Leemans *et al.*, 2018).

Os carcinomas de orofaringe apresentam a maior prevalência de HPV em relação aos outros subsítios de cabeça e pescoço. Castellsague e col (2016) (Castellsague *et al.*, 2016) observaram que 24,9% dos carcinomas de orofaringe estão relacionados com infecção por HPV e, desses, 83% por HPV 16 (Castellsague *et al.*, 2016). Segundo revisto por Leemans e col. (2018) (Leemans *et al.*, 2018), a preferência do vírus pela orofaringe não está bem esclarecida, mas existem indicações de que as criptas tonsilares apresentam características que estimulam o potencial oncogênico do vírus (Leemans *et al.*, 2018).

À primeira vista, seria esperado que os tumores HPV positivos tivessem um comportamento agressivo. Entretanto, já é bem conhecido que esses casos possuem um melhor prognóstico que os HPV negativos (Mellin *et al.*, 2003). A explicação está no fato de o HPV silenciar a proteína p53 por meio da interação com a proteína viral E6, enquanto os tumores HPV negativos possuem o gene TP53 mutado, provavelmente em função de exposição crônica a carcinógenos do tabaco e da presença de outras mutações associadas. Assim, o tratamento dos casos positivos pode reativar o gene normal e ter maior sucesso que aqueles com o gene mutado (Leemans *et al.*, 2011). Outras explicações residem na idade mais baixa e na detecção mais precoce dos casos positivos.

Os casos HPV negativos mostram geralmente perfis alterados de expressão de marcadores de EMT, motilidade celular, invasividade e angiogênese enquanto os HPV positivos apresentam principalmente alterações do ciclo celular e de proliferação (Leemans *et al.*, 2018). A relação entre infecção por HPV, que tem bom prognóstico, e EMT, classicamente associada a fenótipos mais agressivos, é complexa, como foi discutido por Lefevre e col. (2017) em seu estudo de uma coorte de 296 pacientes com carcinoma de orofaringe (Lefevre *et al.*, 2017). A casuística avaliada por esses autores não mostrou

associação significativa entre EMT e status HPV, embora seus dados tenham sido extraídos de uma população mista, com diferentes fatores de risco simultâneos (HPV, fumo e álcool). Entretanto, dois estudos que utilizaram dados de 50 a 80 pacientes com carcinoma de orofaringe, observaram uma associação positiva de marcadores de EMT (aumento de expressão de vimentina e/ou redução de E-caderina) com infecção por HPV (Hatakeyama *et al.*, 2014; Wakisaka *et al.*, 2015). A questão, portanto, permanece não esclarecida e necessita ser melhor investigada.

Os estudos *in vitro* têm mostrado que a presença estável de E6/E7 de HPV 16 levam a mudanças de expressão dos fatores transpcionais SLUG, TWIST, ZEB 1 e 2 em células de epitélio renal de cão (Jung *et al.*, 2013) e de SNAIL1 e ZEB1 em células de câncer de pulmão (Zhang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Níveis elevados de vimentina e fibronectina e expressão reduzida de E-caderina também já foram observados em queratinócitos humanos normais (Hellner *et al.*, 2009) e em células de carcinoma cervical (Faghihloo *et al.*, 2016) transfectadas com E6/E7 de HPV 16. Portanto, *in vitro*, os dados apontam para uma relação entre HPV e EMT.

OBJETIVOS

Considerando que (a) os carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço são observados geralmente em um contexto de inflamação crônica, (b) o comportamento biológico de um tumor está diretamente associado à sua capacidade de ativar o processo de transição epitélio-mesenquimal, e (c) os tumores de cabeça e pescoço positivos para HPV possuem um comportamento menos agressivo e melhor resposta a tratamento que os HPV negativos, a presente proposta teve como objetivo geral analisar o papel da infecção por HPV e de mediadores de inflamação na transição epitélio-mesenquimal em CECP, ou seja, na progressão neoplásica. Os objetivos específicos do presente estudo são:

1. Clonar as sequências E6/E7 de HPV 16 em vetor de expressão e inserir o vetor recombinante em células de CECP e em queratinócitos normais.
2. Selecionar manualmente genes relacionados à EMT na literatura disponível em bancos de dados públicos.
3. Analisar, em linhagens celulares de CECP e queratinócitos normais, o efeito da expressão de sequências E6 e E7 de HPV 16 nos níveis de transcritos de marcadores de EMT selecionados.
4. Investigar, em linhagem celular de CECP e queratinócitos normais, o efeito da expressão de sequências E6 e E7 de HPV 16 em proliferação, viabilidade, migração e invasão celular.
5. Analisar, em linhagens celulares de CECP e queratinócitos normais com expressão ectópica de sequências E6 e E7 de HPV 16 (e seu controle), o efeito dos mediadores de inflamação TNF-a, TGF-beta e IL-6 nos níveis de transcritos de marcadores de EMT selecionados.
6. Investigar, em linhagem celular de CECP e queratinócitos normais com expressão ectópica de sequências E6 e E7 de HPV 16 (e seus controles), o efeito dos mediadores de inflamação TNF-a, TGF-beta e IL-6 em proliferação, viabilidade, migração e invasão celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Linhagens Celulares

Foram estudadas as linhagens celulares: HaCat de queratinócitos normais imortalizados espontaneamente, SCC25 (ATCC CRL-1628) proveniente de carcinoma epidermóide de língua (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr Fábio Daumas Nunes da Faculdade de odontologia, USP) e FaDu (ATCC HTB-43) derivada de carcinoma epidermóide de faringe. A presença de mutações no gene *TP53* é citada pela literatura nas linhagens SCC25 e FaDu (Yun *et al.*, 2018).

Métodos

Cultivo Celular

As células SCC25 foram cultivadas em meio DMEM:F12 1:1, as células HaCat em meio DMEM e a linhagem FaDu em meio de cultura MEM, suplementados com soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP) 10%, aminoácidos não essenciais 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), L-glutamina 10 mM (Sigma-Aldrich) e solução de antibiótico/antimicótico 0,1% (Sigma-Aldrich). O crescimento e a morfologia celular foram monitorados a cada 24 h em microscópio invertido e o meio de cultura foi substituído a cada três dias. Quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, as células foram tripsinizadas e subdivididas em duas réplicas. Em resumo, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio, pH 7,2 (PBS). A solução de lavagem foi igualmente aspirada e as células foram tripsinizadas com a adição de solução de tripsina 0,05%-EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C por 2 min para que a tripsina pudesse agir. Após a confirmação do descolamento das células em microscópio, a tripsina foi inativada pela adição de meio com soro fetal bovino 10%. O material foi retirado da garrafa com auxílio de uma pipeta e depositado em dois tubos de ensaio, que foram centrifugados a 1800 g por 2 min. O pellet com células foi ressuspêndido em meio e recultivado. Para manutenção do estoque de linhagens, um dos pellets foi periodicamente

ressuspendido em SFB e solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) 9:1 e conservado em nitrogênio líquido.

Para avaliação do número de células a serem semeadas na fase de recultivo, foi utilizado o contador automático *Countess® Cell Counter* (Invitrogen, Forster City, CA, USA), que utiliza um algoritmo para análise de imagens e para cálculo do número de células vivas e mortas. Uma alíquota de 5 µl de meio contendo as células tripsinizadas foi adicionado a um tubo *eppendorf* com 5 µL de azul de tripano (Sigma-Aldrich) e os 10 µL totais foram aplicados em lâmina própria para contagem. As células vivas brilham devido à ausência do corante em seu interior, pois a membrana celular íntegra impede sua entrada. As células mortas, ao contrário, ficam opacas por causa da presença do azul de tripano em seu citoplasma, uma vez que a membrana celular não é mais seletiva. O número de células viáveis/mL identificadas pelo aparelho foi utilizado para calcular o volume de meio com células a ser semeado.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional, específico para manutenção da esterilidade dos materiais bem como para evitar a contaminação das culturas.

Cultura de bactéria

A bactéria utilizada nos experimentos de clonagem foi a DH5 α cultivada em meio LB líquido. O meio LB foi produzido com 1 g de triptona (FisherBiotech, Wembley, Austrália), 0,5 g de extrato de levedura (FisherBiotech), 1 g de NaCl (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) e 100 mL de água destilada, seu pH foi ajustado para 7 e, em seguida, foi autoclavado. O meio utilizado nas placas de cultura foi o mesmo, apenas com adição de 3,75 g da ágar (Sigma-Aldrich).

Clonagem da sequência E6/E7 de HPV 16 em vetor de expressão

1. Análise da sequência viral para desenho de iniciadores

As sequências dos genes E6 e E7 foram localizadas no genoma do HPV 16 com auxílio da ferramenta BLAST (Blast, 2019). Os iniciadores foram desenhados com a ferramenta *primer3* (Koressaar T, 2007; Untergasser A, 2012) e testados com a ferramenta *in-silico PCR* do BLAT (Blat, 2019) para confirmação de produtos de PCR. Nas extremidades dos iniciadores sense e anti-sense, foram adicionadas sequências dos sítios de restrição das enzimas

BamHI e NotI, respectivamente, para posterior utilização em digestão e ligação do fragmento ao vetor de interesse. Também foram colocadas sequências TTT nas extremidades 5' para dar estabilidade aos iniciadores.

2. Seleção de vetor de expressão

O vetor selecionado para inserção do fragmento E6/E7 de HPV 16 foi o pcDNA 3.1 His C (Invitrogen by Life Technologies), gentilmente cedido pela Dra. Ana Carolina Terzian, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São Paulo, SP,. Os sítios de restrição do vetor permitem sua abertura pelas enzimas BamHI e NotI (Thermo Scientific) e formação de pontas coesivas no fragmento amplificado. Também permitem a posição correta de leitura (*in frame*) para que ocorra a expressão do fragmento pelo promotor do vetor após sua ligação. A análise da matriz de leitura foi realizada com o auxílio do programa Accelrys Gene.

O vetor pcDNA 3.1 His C possui um promotor forte (CMV - citomegalovírus), que permite alto nível de expressão da proteína recombinante, bem como o promotor SV40 (*simian virus 40*), que permite alto nível de expressão do gene *neomycin* de resistência à geneticina, no caso de seleção em eucariotos, além do gene ampicillin de resistência para ampicilina, no caso de seleção em procariotos (Figura 9).

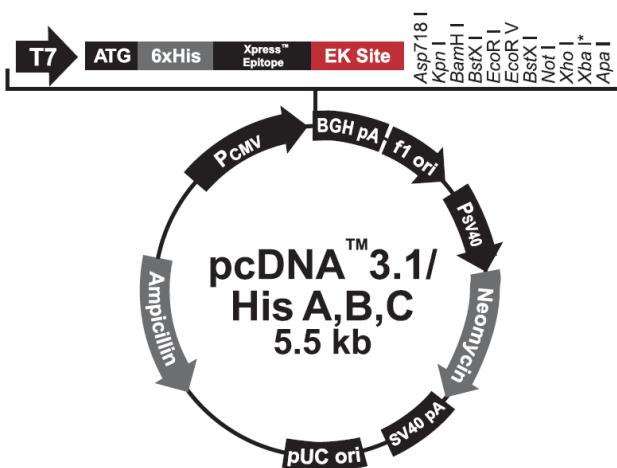


Figura 9. Esquema do vetor de expressão pcDNA 3.1 His C. esquema do vetor com o gene *neomycin* de resistência ao antibiótico geneticina, as sequências promotoras CMV e SV40, os sítios de restrição e o gene *ampicillin* de resistência ao antibiótico ampicilina.

3. Amplificação dos genes E6/E7 a partir do DNA genômico de HPV 16

Uma amostra de DNA genômico de HPV 16, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo/ICESP, São Paulo, SP, foi submetida à amplificação por PCR de um fragmento de 755 pb, no qual estão presentes os genes de interesse E6/E7.

A reação foi realizada em ciclador de temperatura programável (Mastercycle gradiente Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), em volume de 50 µL contendo Tris-SO₄ 60 mM, pH 8,9, (NH₄)SO₄ 18 mM, MgSO₄ 2 mM, 200 µM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e 200 mM de cada iniciador. Cada ciclo compreendeu 1 min de desnaturação a 95°C, 1 min de anelamento a 55°C e 2 min de alongamento a 72°C, com um total de 40 ciclos. O primeiro ciclo foi precedido por 10 min a 95°C e o último ciclo foi estendido por 8 min a 72°C. O volume total da reação foi analisado em gel de agarose 1%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel* (Uniscience, Osasco, SP, Brasil). Foi sempre incluído na reação um controle negativo sem DNA. O marcador de peso molecular foi o *GeneRuler DNA Ladder* (Thermo Scientific).

4. Extração de DNA de gel

Depois de confirmada a amplificação do fragmento de 755pb por eletroforese em gel de agarose, a banda foi recortada do gel e a extração do DNA foi realizada com auxílio do kit de extração *GenElute Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich), segundo as instruções do fabricante.

5. Digestão do produto de PCR e do vetor de expressão

A digestão com as enzimas BamHI e NotI foi realizada em uma mesma reação, pois ambas apresentavam as mesmas condições salinas para sua atividade máxima e a mesma temperatura de inativação. O vetor de expressão e o produto de amplificação foram digeridos em reações separadas.

O volume total da reação foi de 20 µL: para cada 1 µg de DNA foram utilizados 2 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 0,02%, 0,1 mg/mL BSA), 16 µL de água livre de nucleasse e 2 µL de cada enzima (10U/µL). O material foi incubado por 12 h a 37°C, sendo em seguida inativado a 80°C por 20 min. Após a digestão, o vetor foi analisado em gel de agarose 1% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel* (Uniscience). A extração do vetor foi

realizada com o kit *GenElute Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich) citado previamente.

6. Ligação do fragmento E6/E7 ao vetor de expressão pcDNA 3.1 His C

Anteriormente à ligação do fragmento, o vetor pcDNA 3.1 His C foi tratado com a fosfatase alcalina *Heat Inactivated Alkaline Phosphatase* (Invitrogen by Life Technologies), uma fosfomonoesterase que hidrolisa o fosfato 3' e 5' do DNA. A desfosforilação do vetor auxilia sua ligação ao fragmento, evitando sua recircularização na forma vazia. A inativação da fosfatase foi realizada a 65°C por 5 min.

O vetor e o fragmento foram quantificados no equipamento NanoDrop (Espectrofotômetro ND-1000 Uniscience). A reação de ligação foi realizada pela T4 DNA ligase (Thermo Scientific) e as concentrações de vetor e inserto foram calculados pela seguinte razão de ligação:

$$\text{Quantidade de inserto} = \text{ng vetor} \times \text{Kb inserto} / \text{Kb vetor} \times \text{razão}$$

As razões utilizadas foram:

1:3 – 150 ng vetor:62 ng inserto

1:4 – 150 ng vetor:82 ng inserto

1:5 – 150 ng vetor:103 ng inserto

1:6 – 150 ng vetor:124 ng inserto

A ligação foi realizada utilizando 1,2 µL de enzima T4 ligase (5 U/µL) e 2,5 µL de tampão de reação 10X em um volume final de 20 µL, a 16°C por 16 h, com inativação posterior a 65°C por 10 min.

Amplificação e confirmação do material clonado

Após o processo de ligação dos genes E6/E7 ao vetor de expressão pcDNA 3.1 His C e a confirmação da inserção, os vetores tanto cheios (com inserto pcDNA/HPV) quanto vazios (sem inserto pcDNA) foram inseridos em bactéria (DH5α) para nova confirmação da ligação pcDNA/HPV, amplificação e estoque dos vetores.

7. Cultivo de bactéria e preparação para transformação

Protocolo *Fresh Competent* – bactéria quimiocompetente

As bactérias DH5 α foram retiradas de sua preservação a -80°C, estriadas em meio LB com ágar em placa e incubadas em estufa a 37°C por 24 h. Após seu crescimento, uma colônia foi retirada da placa, colocada em 10 mL de meio LB líquido sem antibiótico e incubada sob agitação de 200 rpm a 37°C por 24 h. Após esse período, 250 μ L do inóculo foi adicionado a 10 mL de meio LB líquido sem antibiótico e seu crescimento foi acompanhado no equipamento Ultrospec 10 (Amersham Biosciences) até densidade de 0,4. Em seguida, a cultura foi mantida em gelo por 10 min e centrifugada a 4°C por 5 min a 3000 rpm, seu sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2,4 mL de CaCl₂ 0,1M gelado ao *pellet*, que foi homogeneizado e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 μ L de CaCl₂ ao *pellet*, que foi homogeneizado e incubado a 4°C por 24 h.

8. Transformação

A inserção do vetor/inserto na bactéria foi realizada por meio de choque térmico com utilização do CaCl₂, que neutraliza as cargas da membrana. Foram adicionados 5 μ L da reação de ligação vetor/inserto em 100 μ L de bactérias quimiocompetentes. A reação foi realizada por 30 min no gelo. Em seguida, o material foi colocado em banho-maria a 42°C por 1 min e novamente em gelo por 2 min, recebeu 300 μ L de meio LB sem antibiótico e foi incubado em rotação de 200 rpm a 37°C por 1 h. As bactérias foram então semeadas em placas com meio LB e ágar e o antibiótico de seleção, ampicilina (Sigma-Aldrich), para que apenas as colônias contendo o vetor crescessem e fossem selecionadas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h.

Após este período, as colônias que cresceram nas placas foram demarcadas, retiradas e colocadas separadamente em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina e incubadas novamente a 37°C por 24 h. Foi, então, realizada uma PCR, denominada *PCR screening*, necessária para identificação das colônias com o vetor contendo o inserto. Essa reação é realizada da mesma maneira que a reação de PCR para amplificação do fragmento E6/E7 descrita acima, com uma diferença: no estágio inicial do primeiro ciclo, foi acrescentada uma etapa de 95°C por 10 min, para romper a membrana da bactéria e expor o vetor para amplificação. O controle da reação foi um vetor original, sem nenhuma

modificação. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel* (Uniscience).

9. Miniprep

As colônias em meio LB líquido positivas para a presença de vetor foram centrifugadas a 12000 g por 1 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de TE pH 8 e, após adição de 200 µL de SDS/NaOH, foi incubado a 37°C por 5 min. Foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3M pH 4,8 e o material foi centrifugado a 12000 g por 6 min. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1 mL de isopropanol ao *pellet*, que foi incubado a 37°C por 5 min e novamente centrifugado por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado 2 vezes com 1 mL de etanol 75% gelado, secado, ressuspensionado em 50 µL de TE e armazenado a -20°C.

As colônias positivas também foram estocadas para uso futuro: 500 µL de meio LB líquido com as bactérias foram adicionados a 500 µL de glicerol 50% e, então, armazenadas em freezer -80°C.

Transfecção e expressão dos genes E6/E7 em linhagens celulares

As linhagens celulares HaCat e SCC25 foram utilizadas em ensaio de indução permanente de expressão dos genes E6/E7 de HPV 16, cujo efeito em morfologia, proliferação, migração e invasão celular foi avaliado.

Para indução de expressão, foi utilizado o vetor comercial pcDNA 3.1 His C. Como controles negativos, foram utilizados o mesmo vetor sem o inserto e células sem o vetor. O ensaio foi realizado utilizando o protocolo do *Neon Transfection System* (Invitrogen), que induz poros na membrana celular permissíveis a fluxo de íons e moléculas.

Previamente à transfecção, as linhagens foram cultivadas em meios de cultura específicos contendo SFB 10% até atingirem a confluência de 70% em garrafas médias (75 cm²). No primeiro dia do experimento, as células foram tripsinizadas e contadas no *Countess® Cell Counter* (Invitrogen), como descrito anteriormente. Uma alíquota com 3x10⁵ células foi ressuspensionada com reagente específico do kit *Neon Transfection* e recebeu 15 µg do vetor seguindo o protocolo do fabricante para reações de 100 µL. Três condições foram avaliadas: (a) suspensão de células contendo o vetor com os genes E6/E7 (pcDNA/HPV), (b) suspensão de células contendo o vetor sem os genes E6/E7 (pcDNA) e (c)

controle de reação sem vetor. O material das três condições foi submetido a eletroporação com 23 diferentes intensidades de pulsos elétricos para escolha do melhor procedimento (1000 V, 1 pulso, comprimento de pulso de 40 s).

As células foram cultivadas em seus respectivos meios com SFB 10% sem antibiótico por 24 h e foram selecionadas por 15 dias em meio com o antibiótico geneticina (G-418, Sigma-Aldrich) na concentração final de 700 µg/mL. Como os vetores possuem o gene de resistência para geneticina, apenas as células transfectadas sobreviveram nessas condições.

As culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido para avaliação da morfologia celular e a cada 48 h o meio de cultura com antibióticos foi substituído por meio novo. A eficiência da indução de expressão dos genes E6/E7 foi avaliada por PCR com os mesmos iniciadores e condições descritas para amplificação inicial dos genes E6/E7 utilizados para clonagem. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel* (Uniscience).

Análise da morfologia celular

A análise da morfologia celular das linhagens foi realizada rotineiramente utilizando microscópio invertido. As culturas foram fotografadas periodicamente para registro de mudanças de morfologia depois do processo de transfecção e expressão dos genes E6/E7 de HPV 16.

Ensaios com mediadores de inflamação

Os mediadores de inflamação foram introduzidos no meio de cultura das linhagens na concentração de:

IL-6 (Gold Biotechnology, USA) – 30 ng/mL,

TNF-a (Gold Biotechnology, USA) - 20 ng/mL,

TGF-beta-1 (BioLegend, USA) – 20 ng/mL

As linhagens, com HPV e sem HPV, contendo esses mediadores foram submetidas a ensaios funcionais de proliferação, viabilidade, migração e invasão e de PCR em tempo real para análise de marcadores de EMT. O meio de cultura foi trocado a cada 24 h e os mediadores também foram novamente adicionados no mesmo momento. O tempo de tratamento foi o tempo dos experimentos: os ensaios de proliferação e viabilidade tiveram duração de 96 h, o de migração teve duração de 24 h, o de invasão 48 h e o ensaio para extração de RNA e

avaliação de expressão de marcadores de EMT teve duração de 72 h. As condições de estudo utilizadas no tratamento com mediadores foram: controle (sem adição de mediador), tratamento individual com IL-6, TNF- α , TGF-beta-1 e associação dos três mediadores. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Um esquema do protocolo utilizado está apresentado na Figura 10.

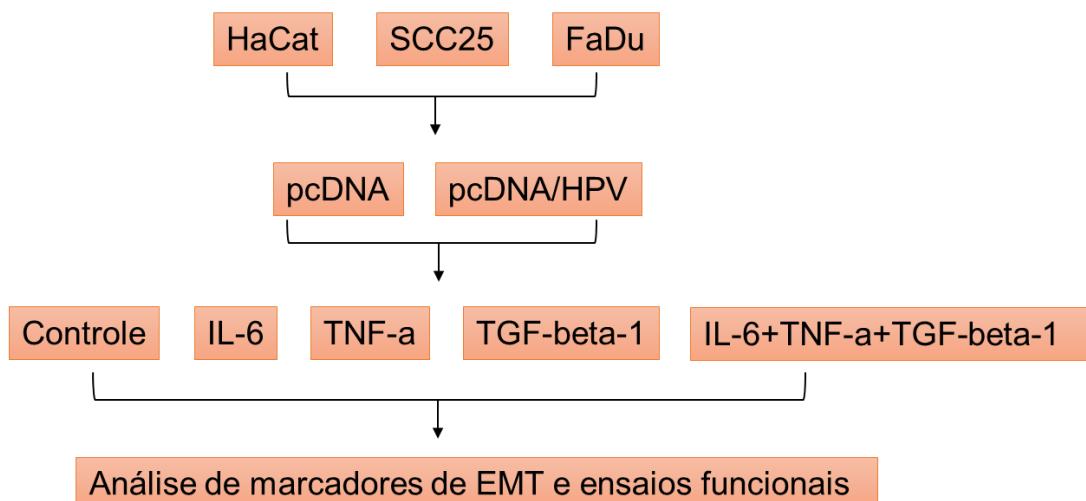


Figura 10. Esquema dos experimentos realizados com as linhagens HaCat, SCC25 e FaDu.
As células foram transfectadas com vetor vazio (pcDNA) para controle e com vetor com os genes E6/E7 de HPV 16, e posteriormente tratadas com mediadores inflamatórios.

Ensaios Funcionais

Os ensaios funcionais foram realizados para análise das linhagens HaCat e SCC25 transfetadas com o vetor pcDNA 3.1 His C contendo os genes E6/E7 de HPV 16 (pcDNA/HPV) tratadas com os mediadores de inflamação nas condições relatadas acima.

Ensaio de proliferação celular

Para avaliar seu potencial proliferativo, as células foram cultivadas em meio sem SFB por 24 h (para sincronização inicial do ciclo celular), em triplicatas, com 2×10^4 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 h, o meio foi trocado por meio com SFB 10% contendo os mediadores e, a cada 24 h até completar 96 h, uma triplicata de cada condição foi tripsinizada e as células vivas foram contadas no *Countess® Cell Counter* para posterior elaboração de uma curva de proliferação.

Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo *The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay- MTS* (Promega), um método colorimétrico utilizado para determinar o número de células viáveis. Nesse ensaio, o sal de tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) é biorreduzido pelas células vivas com formação do composto solúvel formazan, que produz mudança de coloração no meio. A quantidade de formazan é mensurada por espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm e diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

O ensaio de viabilidade foi realizado nas mesmas condições que o ensaio de proliferação, exceto pelo número de células plaqueadas (3×10^3 células/poço), utilização de placas de 96 poços e contagem de células em leitor de placas (*TP-Reader-ThermoPlate*, Thermo).

Ensaio de Migração e Invasão Celular

O efeito da indução de mediadores inflamatórios e dos genes E6/E7 de HPV 16 na migração foi avaliado em triplicatas em placas de 24 poços com insertos ou câmaras de 6,5 mm de diâmetro contendo uma membrana de 8 µm de porosidade (*BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers – MIC*, Franklin Lakes, NJ, USA). Um total de 4×10^4 células/300 µL de meio sem SFB foram semeadas no compartimento superior do inserto. No compartimento inferior (correspondente ao poço da placa de cultivo), foram adicionados 500 µL de meio suplementado com SFB 10% e os mediadores de cada condição. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 24 h a 37°C e CO₂ 5%, durante o qual as células, atraídas pelo soro, migraram pela membrana em direção ao compartimento inferior da câmara. As células presentes no inserto foram fixadas com formaldeído 0,4% à temperatura ambiente por 20 min. Aquelas presentes na superfície superior da membrana (e que, portanto, não migraram) foram retiradas com o auxílio de uma haste de algodão, enquanto as células presentes na face inferior foram coradas por 5 min com o composto fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol/DAPI (Uniscience) e submetidas a um passo de lavagem com PBS 1X. Cinco campos da superfície inferior da membrana, selecionados casualmente, foram fotografados em microscópio de fluorescência invertido

utilizando o programa *Axiovision Release 4.8* e as células presentes foram contadas nas fotografias obtidas.

A invasividade celular foi avaliada nas mesmas condições que o ensaio de migração, mas em câmaras de invasão com matrigel, contendo insertos de 6,5 mm de diâmetro com membranas de 8 µm de porosidade (*BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers – MIC*). Esse ensaio baseia-se no fato de as células com capacidade invasiva serem capazes de degradar o matrigel, que faz a função da matriz extracelular no tecido vivo, e migrar em direção ao meio com soro. As células foram inoculadas no inserto, na mesma concentração utilizada no ensaio de migração e, após 48 h a 37°C e CO₂ 5%, foram fixadas com formaldeído 0,4% à temperatura ambiente por 20 min. As células remanescentes que não degradaram o matrigel (presentes, portanto, na superfície superior da membrana) foram igualmente retiradas com o auxílio de uma haste de algodão. Os passos seguintes seguiram o mesmo protocolo do ensaio de migração.

Avaliação da expressão de marcadores de EMT

Extração sequencial de RNA, DNA e proteínas

As linhagens HaCat, SCC25 e FaDu foram semeadas com densidade de 1x10⁶ e cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Após sua adesão ao frasco, o meio de cultura foi trocado por meio sem soro para sincronização do ciclo celular. As células foram mantidas nesse meio por 24 h, tempo suficiente para que ingressassem na fase G₀. Após esse período, o meio foi substituído por meio com SFB e as células foram cultivadas por 72 h com os mediadores inflamatórios. O meio de cultura com os mediadores foi substituído a cada 24 h.

O RNA, o DNA e as proteínas foram extraídos pelo método do TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), segundo protocolo já estabelecido no laboratório.

O meio das garrafas de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS. Após esse passo, foram adicionados 3 mL de trizol, uma solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina, que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. O material foi distribuído em tubos de 1,5 mL e mantido à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, recebeu 200 µL

de clorofórmio gelado para cada mL de amostra em trizol, foi homogeneizado por 1 min e incubado por 10 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 15 min a 4ºC, para separar a fase aquosa, que contém RNA, da interfase branca e leitosa que contém DNA, e da fase orgânica com proteínas. A fase aquosa com RNA foi transferida para um novo tubo com 500 µL de isopropanol gelado e 10 µg de glicogênio e mantida por 20 min à temperatura ambiente. Após essa etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 15 min a 4ºC e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de etanol 70% gelado, agitado até se soltar do tubo e centrifugado a 14000 g por 2 min a 4ºC. O excesso de etanol foi retirado por pipetagem e os tubos foram colocados em banho seco a 42ºC por 1 min para secagem total do precipitado. O material foi ressuspensido em 20-50 µL (dependendo do tamanho do sedimento) de água livre de nucleases. As amostras foram colocadas em banho seco a 55ºC por 10 min para melhor eluição do RNA. Uma alíquota foi utilizada para quantificação e análise da integridade do RNA. A fase com DNA e proteínas foi armazenada a -80 ºC.

Quantificação e avaliação da integridade do RNA das linhagens celulares

A quantificação e a avaliação da integridade do RNA das linhagens foram realizadas no *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Este sistema utiliza eletroforese capilar em microchip, que é feita em versão microfluídica e não ocorre no interior de uma coluna capilar, mas em microcanais fabricados em pequenos blocos. Com esse tipo de eletroforese, é possível separar fragmentos de DNA, RNA e proteínas e posteriormente detectá-los por fluorescência induzida por laser.

Foi utilizado o *RNA 6000 Nano kit* (Agilent Technologies), que possui chips e reagentes desenhados para análise de fragmentos de RNA. Cada chip contém uma rede interconectada de microcanais e poços definidos para as amostras de interesse e para cada um dos reagentes (gel, solução de corante fluorescente e marcadores de peso molecular). O ensaio foi realizado segundo instruções do fabricante.

Reação em Cadeia da Polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR)

De acordo com o resultado da quantificação, foi preparado um volume de RNA com 5 ug. O RNA foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega,

Madison, WI, USA) para eliminação de DNA genômico, em reação com volume final de 25 µL.

O cDNA foi confeccionado pela reação de transcrição reversa com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Esse sistema utiliza a enzima transcriptase reversa *MultiScribe* e iniciadores aleatórios – *random primers* - para a síntese do DNA complementar. Os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados na reação de transcrição reversa foram: 5 µL de iniciadores 10X, 2 µL de dNTPs 100 mM, 5 µL de tampão 10X, 2,5 µL de enzima *MultiScribe* 50 U/µL. Os reagentes foram adicionados aos 25 µL obtidos após processamento com DNase. O volume da reação foi completado para 50 µL com água tratada com DEPC. As condições da reação de RT-PCR foram: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 4°C ∞. No final da reação, foram acrescentados 50 µL de água tratada com DEPC, sendo o volume final igual a 100 µL e a concentração de cDNA igual a 50 ng/µL. Os cDNAs foram então armazenados a -20 °C para posterior análise de expressão gênica.

Seleção e desenho de iniciadores relacionados a transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Os genes relacionados a EMT foram selecionados por busca na literatura sobre sua importância no desenvolvimento da transição e no câncer. A busca foi realizada no PubMed (Pubmed) com os termos MeSH (Mesh), *epithelial mesenchymal transition and neoplasms*. As sequências dos genes selecionados foram localizadas no genoma humano e seu RNAm (RefSeq) foi acessado com o auxílio da ferramenta Gene do NCBI (Gene, 2019). Os iniciadores foram desenhados com a ferramenta *primer3* (Koressaar T, 2007; Untergasser A, 2012) e testados com a ferramenta *in-silico PCR* do BLAT (Blat, 2019) e BLAST (Blast, 2019) para confirmação de produtos de PCR.

Análise de PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada no equipamento *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems) com o sistema *SYBR Green* (Applied Biosystems).

No sistema *SYBR Green*, os iniciadores específicos para cada transcrito foram selecionados como descrito acima e as reações foram realizadas em

volumes de 20 µL, contendo 50 ng de cDNA, 1 µL de iniciadores na concentração 10 µM, 10 µL de *Power Master Mix SYBR Green Fast™* (Thermo) e 7 µL água. O *Power Master Mix SYBR Green™* contém todos os componentes para a reação de PCR em tempo real, exceto o molde, os oligonucleotídeos iniciadores e a água. As condições de reação compreenderam uma etapa inicial de 2 s a 95°C para inativação da *uracil-N-glicosilase* (UNG), evitando, dessa forma, que a enzima degrade os produtos da termociclagem a ser iniciada em seguida, e também para ativação da enzima *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems). Posteriormente, foram programados 40 ciclos de 3 s a 95°C e 30 s a 60°C para extensão. Foi acrescentado um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15 s a 95°C, intercaladas por uma etapa de 1 min a 60°C e 15 s a 95°C e 15 s a 60°C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de *primer dimers*, produtos inespecíficos e de contaminações. O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador.

A eficiência dos iniciadores foi avaliada por curva padrão e foram empregadas cinco concentrações diferentes de cDNA da linhagem celular utilizada, a saber, amostra pura e suas cinco diluições em água DEPC 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5.

A fórmula utilizada para avaliação da expressão dos genes foi:

$$\text{Taxa relativa de expressão} = 2^{-(\Delta Ct \text{ do gene alvo} - \Delta Ct \text{ do calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene alvo pela média dos Cts do gene constitutivo ou calibrador.

Foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão ≥ 2.0 ou ≤ -2.0 em relação ao tecido controle, após a transformação dos valores para logaritmo de base 2. Dessa forma, um valor de expressão relativa igual a +1 equivale a um aumento de expressão de 2 vezes, e um valor de -1 equivale a uma diminuição de expressão de 2 vezes.

Análise estatística e análise por ferramentas de bioinformática

Os dados obtidos nos ensaios funcionais foram analisados pelo teste estatístico ANOVA multifatorial seguido do teste de Tukey (utilizando $p < 0,05$) do programa miniTAB 16. O programa *GraphPad prism* (GraphPad Software Inc., San Diego – CA, EUA) foi utilizado para análise estatística e confecção de gráficos dos ensaios de PCR em tempo real (Teste t - não pareado, $p \leq 0,05$). O

programa DAVID 2.6 (Huang Dw, S. B., Lempicki Ra, 2009; Huang Dw, S. B., Lempicki Ra., 2009) foi utilizado para elaborar as análises funcionais e o STRING (String) foi utilizado para observar as interações entre os genes envolvidos na EMT.

RESULTADOS

Clonagem da sequência E6/E7 de HPV 16 em vetor de expressão

Análise da sequência viral para desenho de iniciadores

As sequências dos iniciadores para amplificação de E6/E7 estão sublinhadas na sequência parcial do genoma do HPV 16 apresentada a seguir (Figura 11). Como referido no capítulo de Material e Métodos, os iniciadores receberam sítios de restrição BamHI (GGA TCC) e NotI (GCG GCC GC) nas extremidades 5' e 3', respectivamente, além da sequência TTT na extremidade 5'.

```
>NC_001526.4 Human papillomavirus type 16, complete genome
5' .....ACTACAATAATTCTATGTATAAAACTAAGGGCGTAACCGAAATCGGTGAACCGAAACCGGTTAGT
ATAAAAGCAGACATTATGCACCAAAAGAGAACGTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAA
GTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATACATGATATAATTAGAATGTGTACTGCAAG
CAACAGTTACTGCGACGCTGAGGTATATGACTTGCTTCGGGATTATGCATAGTATATAGAGATGGGA
ATCCATATGCTGTATGTGATAAAATGTTAAAGTTTATTCTAAAATTAGTGTAGTATAGACATTATTGTTA
TAGTTGTATGAAACAACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGATTGTTAATTAGGTGTATT
AACTGTCAAAAGCCACTGTGTCCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATA
TAAGGGGTCGGTGGACCGGTGATGTATGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCT
GTAATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCCAGAGACAACGTGATC
TCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGC
AGAACCGGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGC
GTACAAAGCACACACGTAGACATTGCTACTTGGAAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCC
CCATCTGTTCTCAGAAACCATAATCTACC2 3'
```

Figura 11. Sequência parcial do genoma de HPV 16. As sequências dos genes E6 e E7 estão apresentadas em cinza claro e cinza escuro, respectivamente, e as sequências dos iniciadores estão sublinhadas.

Amplificação dos genes E6/E7 a partir do DNA genômico de HPV 16

A amplificação do fragmento de 755pb ocorre próximo à extremidade 5' do gene E6 e da extremidade 3' do gene E7. Após eletroforese do produto, o fragmento de interesse foi retirado do gel de agarose para posterior digestão e inserção no vetor de expressão pcDNA 3.1 His C.

Digestão do produto de amplificação e do vetor de expressão

O produto de amplificação contendo os genes E6 e E7 do HPV foi digerido com as enzimas BamHI e NotI. O vetor de expressão pcDNA 3.1 His C foi digerido com as mesmas enzimas e sua linearização foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 12). O vetor circular (não digerido) é

mais compacto que o linear e, por esse motivo, sua banda no gel está localizada em posição distinta.

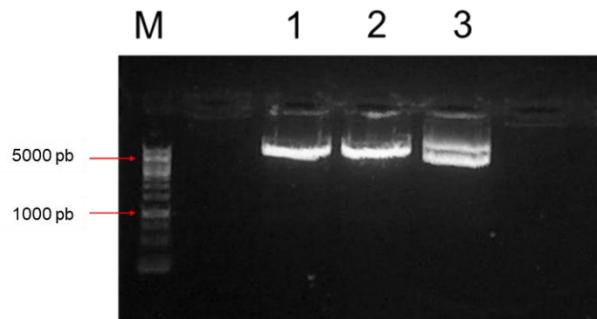


Figura 12. Eletroforese do vetor pcDNA 3.1 His C em gel de agarose 1% corado com GelRed. Linhas 1 e 2: vetor linearizado após digestão com as enzimas BamHI e NotI; linha 3: vetor circular controle não submetido a digestão (seta). M = marcador padrão de peso molecular 1kb.

Transformação e seleção de bactérias com o inserto

Após a reação de ligação do fragmento E6/E7 ao vetor pcDNA3.1HisC, foi realizada a confirmação da inserção por PCR do fragmento de interesse e, em seguida, a transformação das bactérias DH5 α utilizando vetores (com inserto pcDNA/HPV) e vazios (sem inserto). A Figura 13 mostra colônias bacterianas cultivadas em meio LB com ágar selecionadas pelo antibiótico ampicilina, após inserção do vetor pcDNA 3.1 His C com sequência E6/E7. No total, foram coletadas 22 colônias brancas, que foram semeadas em meio LB líquido para posterior seleção por PCR screening.

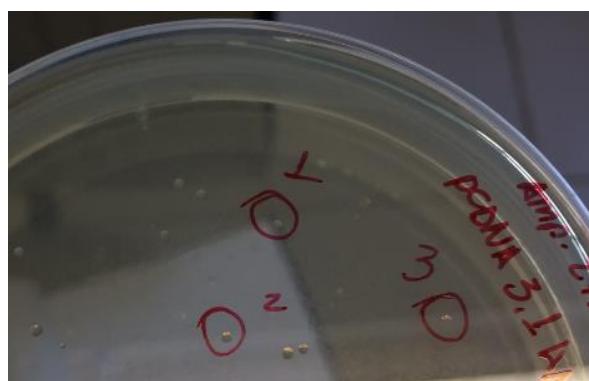


Figura 13. Colônias brancas de bactérias DH5 α . Colônias brancas de bactérias transfetadas com o vetor pcDNA 3.1 His C contendo as sequência E6/E7 e selecionadas pelo antibiótico ampicilina.

PCR Screening – confirmação da ligação do inserto (genes E6/E7) no vetor pcDNA

Para confirmação da presença do vetor com o inserto, as colônias de bactérias selecionadas por ampicilina foram submetidas à PCR screening. Os resultados mostraram seis colônias positivas de um total de 22. A Figura 14 mostra o gel de agarose com os produtos da reação.

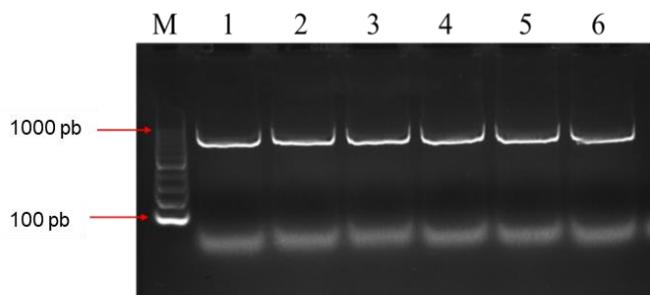


Figura 14. Gel de agarose 1% corado com GelRed para confirmação da ligação do vetor pcDNA 3.1 His C ao inserto contendo os genes E6/E7. O fragmento de 755 pb foi observado em 6 colônias (linhas 1 a 6). M = marcador padrão de peso molecular 100 pb.

Confirmação da transfecção e da expressão de E6/E7 em linhagens celulares

Após a transfecção das linhagens HaCat, SCC25 e FaDu com os genes E6/E7 de HPV 16, foi extraído o RNA e realizada uma reação de amplificação com os mesmos iniciadores utilizados para amplificação dos genes E6/E7 a partir do DNA genômico de HPV 16 durante a clonagem. Esse procedimento foi efetuado antes dos ensaios funcionais para confirmação da presença e expressão de E6/E7. Os resultados da eletroforese dos amplificados em gel de agarose estão apresentados na Figura 15.

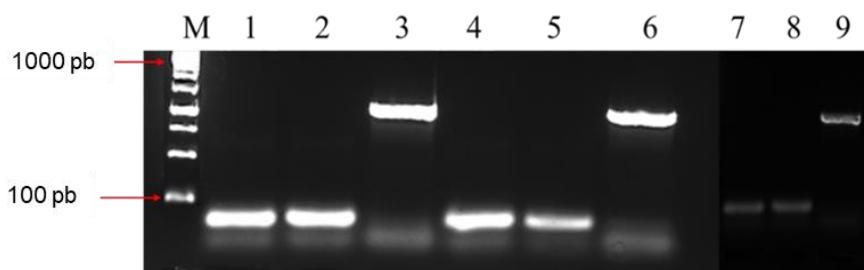


Figura 15. Gel de agarose 1% corado com GelRed para confirmação da expressão dos genes E6/E7 nas linhagens transfectadas. Linhas 1-3 - HaCat, linhas 4-6 - SCC25 e linhas 7-9 - FaDu. Linhas 1, 4 e 7 - controle sem vetor; linhas 2, 5 e 8 - controle com vetor vazio (pcDNA); linhas 3, 6 e 9 vetor com os genes E6/E7 (pcDNA/HPV). M = marcador de peso molecular 100 pb.

Análise de morfologia celular

Como o produto de amplificação clonado em vetor de expressão continha a sequência dos genes E6 e E7, o efeito da expressão desses dois genes foi analisado em conjunto nos ensaios funcionais.

Foi observada uma mudança na morfologia das linhagens HaCat e SCC25 após a transfecção permanente com os genes E6/E7 em comparação com as células transfectadas com o vetor vazio. A linhagem SCC25 apresentou uma morfologia um pouco mais alongada e uma disposição menos agrupada quando transfectada com E6/E7 (Figura 16 A-B). Na linhagem HaCat, foi observado maior adensamento quando as células foram transfectadas com E6/E7 em comparação com seu controle (Figura 16 C-D). Na linhagem FaDu, não foi observada qualquer alteração na morfologia celular.

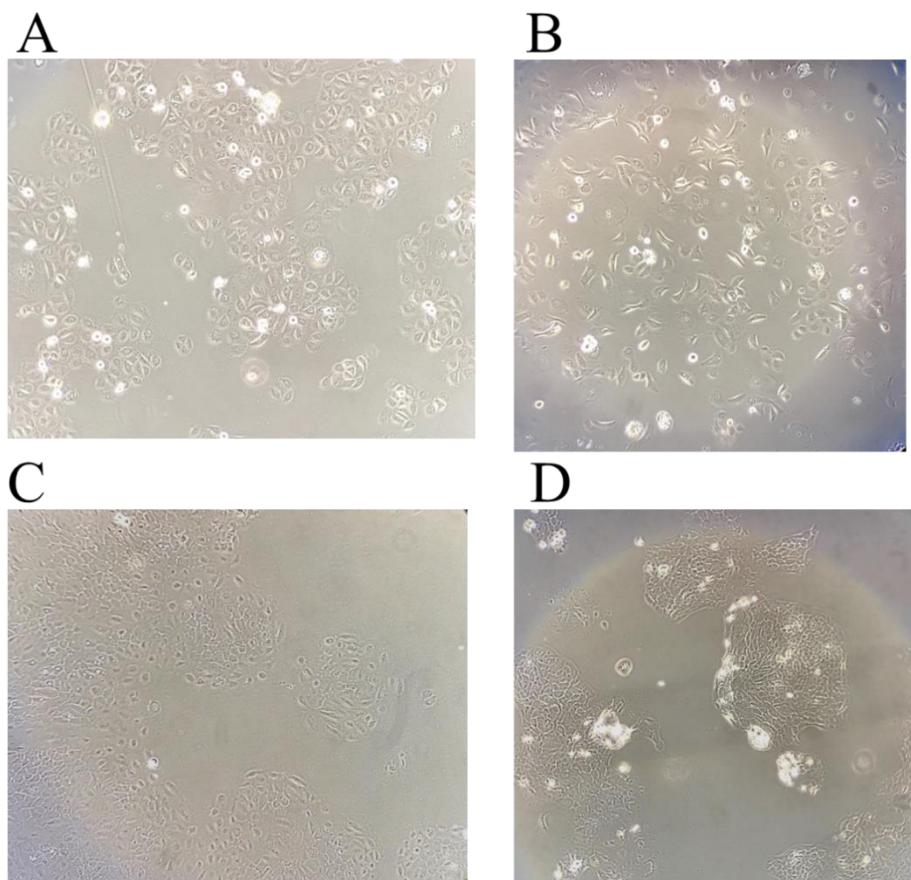


Figura 16. Morfologia celular das linhagens SCC25 e HaCat. Alteração do adensamento e da morfologia celular das linhagens SCC25 (A e B) e HaCat (C e D). A e C - células transfectadas com vetor vazio (pcDNA); B e D células transfectadas com pcDNA/HPV. Aumento 20X.

Ensaios funcionais

Os ensaios funcionais foram realizados para compreender o efeito da expressão dos genes E6 e E7 de HPV 16 e do ambiente inflamatório em linhagem tumoral SCC25 e normal HaCat. Ambas as linhagens foram transfectadas com (a) o vetor pcDNA 3.1 HisC contendo os genes E6/E7 de HPV 16 (pcDNA/HPV) na presença ou ausência dos mediadores de inflamação IL-6, TNF-a e TGF-beta-1 em concentrações relatadas no capítulo de Material e Métodos e (b) com o vetor vazio (pcDNA) na ausência dos mediadores de inflamação. Todos os ensaios foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA com valores significativos de * $p\leq 0,05$.

As siglas utilizadas no texto e nas figuras são apresentadas no quadro a seguir:

Célula	Vetor	Tratamento
pcDNA controle	vazio*	
pcDNA/HPV controle	com sequências E6/E7	
pcDNA/HPV	com sequências E6/E7	IL-6, TNF-a e/ou TGF-beta-1

* sem sequências E6/E7

Curva de proliferação

Células SCC25:

Os resultados das comparações realizadas são referidos abaixo e apresentados na Figura 17.

- I. Comparação de SCC25 pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores de inflamação. Os resultados mostraram aumento significativo de proliferação ($p=0,026$) em SCC25.
- II. Comparação de SCC25 pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores de inflamação mostrando diminuição significativa de crescimento no tratamento com TNF-a ($p=0,006$), TGF-beta-1 ($p=0,008$) ou três mediadores simultaneamente ($p=0,001$).

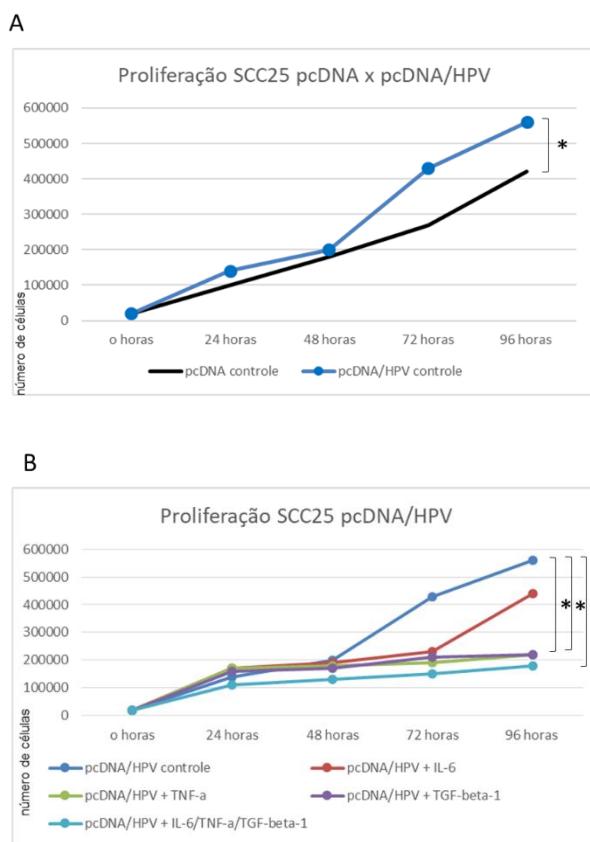


Figura 17. Curva de proliferação da linhagem SCC25. A. Proliferação de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. B. pcDNA/HPV tratado com mediadores inflamatórios. Teste ANOVA ($*p\leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Em resumo, as células SCC25 contendo sequências virais mostraram um aumento de proliferação quando comparadas ao controle contendo o vetor vazio,

mas exibiram redução de proliferação quando tratadas com os mediadores simultaneamente ou com cada uma deles, exceto com IL-6.

Células HaCaT

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 18.

I. Comparação de HaCat pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores de inflamação. Os resultados mostraram diminuição significativa de proliferação ($p=0,01$) em HaCat.

II. Comparação de HaCat pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores de inflamação mostrando diminuição significativa de crescimento no tratamento com TGF-beta-1 ($p=0,004$) ou três mediadores simultaneamente ($p=0,002$).

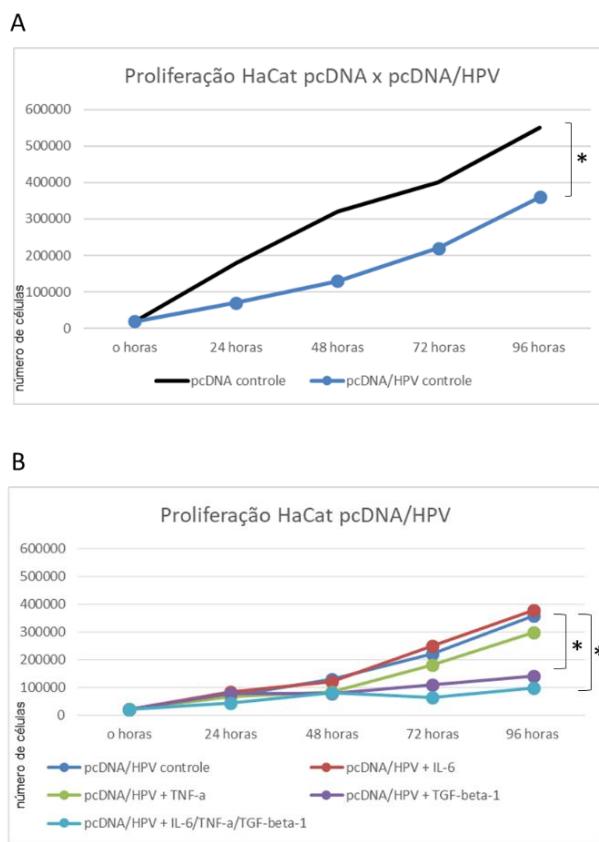


Figura 18. Curva de proliferação da linhagem HaCat. A. Proliferação de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. B. pcDNA/HPV tratado com mediadores de inflamação. Teste ANOVA ($*p \leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Ao contrário do que ocorreu nas células de carcinoma oral, os queratinócitos normais transfectados com sequências virais exibiram diminuição de proliferação na comparação com o controle contendo o vetor vazio, e uma proliferação ainda mais reduzida quando tratados com todos os mediadores simultaneamente ou com cada um deles, exceto com IL-6 ou TNF-a.

Análise de Viabilidade celular

Células SCC25:

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 19.

- I. Comparação SCC25 pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores de inflamação mostrando SCC25 pcDNA/HPV com aumento significativo na viabilidade ($p=0,01$).
- II. Comparação SCC25 pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores de inflamação mostrando aumento significativo de viabilidade no tratamento com IL-6 ($p=0,02$). Diminuição significativa de viabilidade nos tratamentos com TNF-a ($p=0,001$), TGF-beta-1 ($p=0,018$) e com os três mediadores ($p=0,001$).

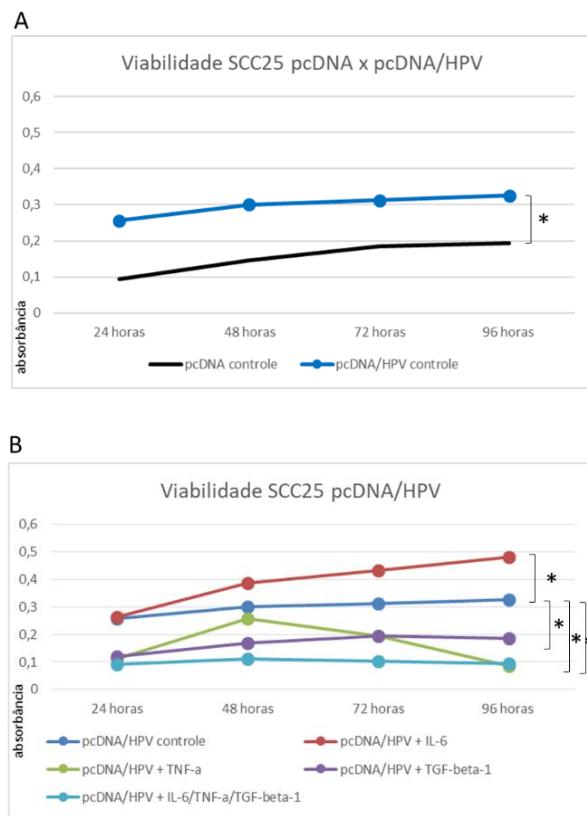


Figura 19. Curva de viabilidade obtida por ensaio de MTS para a linhagem SCC25. A. Viabilidade de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. B. pcDNA/HPV tratado com mediadores de inflamação. Teste ANOVA (*p≤0,05). As comparações estão representadas por chaves na figura.

De maneira similar ao que ocorreu no ensaio de proliferação, as células SCC25 contendo sequências virais mostraram um aumento de viabilidade quando comparadas ao controle contendo o vetor vazio, mas exibiram redução de viabilidade quando tratadas com todos mediadores de inflamação simultaneamente ou com cada um deles, exceto com IL-6.

Células HaCaT

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 20.

- I. Comparação HaCat pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores inflamatórios, não houve diferença significativa entre HaCat pcDNA/HPV e pcDNA ($p=0,09$).
- II. Comparação HaCat pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores inflamatórios, não houve diferença significativa nos tratamentos com IL-6 ($p=0,1$). Diminuição significativa de viabilidade nos tratamentos com TNF-a ($p=0,003$), TGF-beta-1 ($p=0,026$) e com os três mediadores ($p=0,010$).

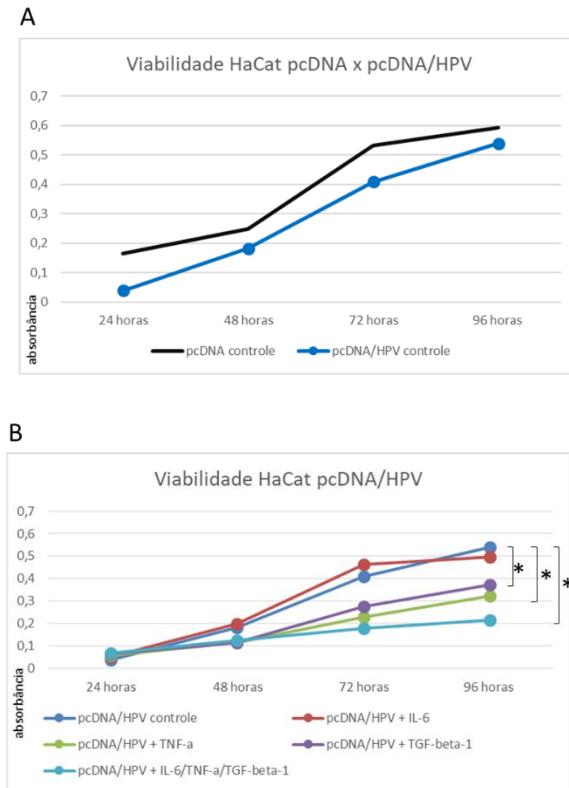


Figura 20. Curva de viabilidade obtidos por ensaio de MTS para a linhagem HaCat. A. Viabilidade de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. B. pcDNA/HPV tratado com os mediadores de inflamação. Teste ANOVA ($*p \leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Em resumo, os queratinócitos normais transfetados com sequências virais mostraram uma diminuição não significativa de viabilidade na comparação com o controle contendo o vetor vazio, e uma viabilidade reduzida significativamente quando tratados com todos os mediadores simultaneamente ou com cada um deles, exceto com IL-6.

Ensaio de migração celular

Células SCC25:

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 21.

I.Comparação SCC25 pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores inflamatórios, SCC25 pcDNA mostrou aumento significativo de migração ($p=0,004$).

II. Comparação SCC25 pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores inflamatórios, não houve diferença significativa nos tratamentos com IL-6 ($p=0,91$), TNF-a ($p=0,86$) e TGF-beta-1 ($p=0,08$). Diminuição significativa de migração no tratamento com os três mediadores associados ($p=0,01$).

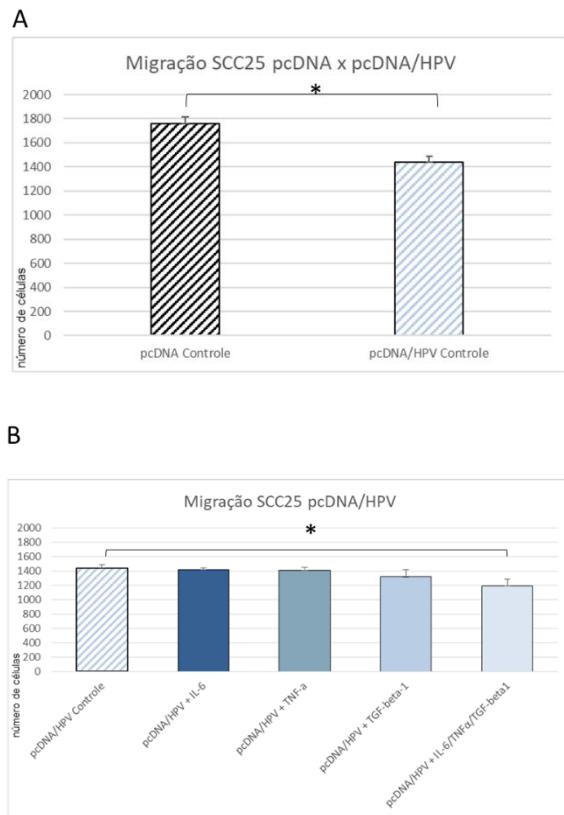


Figura 21. Ensaio de migração da linhagem SCC25. Gráfico com a média do número de células em cinco fotomicrografias de cada triplicata. **A.** Migração de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. **B.** pcDNA/HPV tratado com os mediadores de inflamação. Dados são mostrados como a média das triplicatas \pm SD (desvio padrão). Teste ANOVA ($*p \leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Em resumo, as células SCC25 contendo sequências virais mostraram redução de migração quando comparadas ao controle contendo o vetor vazio, e também exibiram redução de migração quando tratadas com todos os mediadores simultaneamente.

Células HaCaT

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 22.

I. Comparação HaCat pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores de inflamação, não houve diferença significativa entre HaCat pcDNA/HPV e pcDNA ($p=0,31$).

II. Comparação HaCat pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores de inflamação, não houve diferença significativa em migração nos tratamentos com TGF-beta-1 ($p=0,11$). Diminuição significativa de migração nos tratamentos com IL-6 ($p=0,003$), TNF-a ($p=0,001$) e com os três mediadores ($p=0,001$).

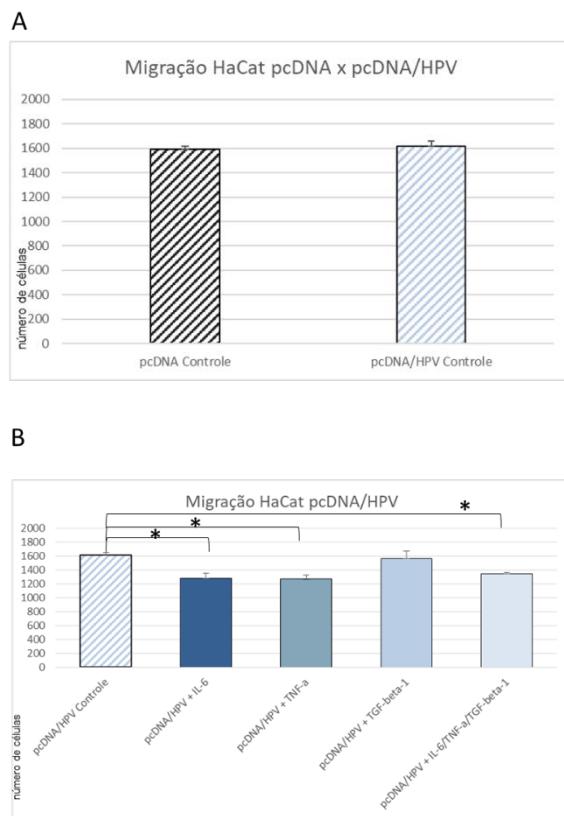


Figura 22. Ensaio de migração da linhagem HaCat. Gráfico com a média do número de células em cinco fotomicrografias de cada triplicata. **A.** Migração de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. **B.** pcDNA/HPV tratado com mediadores de inflamação. Dados são mostrados como a média das triplicatas \pm SD (desvio padrão) pelo teste ANOVA (* $p\leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Na linhagem HaCat, a presença de E6/E7 não alterou as taxas de migração, ao contrário dos tratamentos com os mediadores de inflamação, que reduziram essas taxas.

Ensaio de invasão celular

Células SCC25:

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 23.

- I. Comparação SCC25 pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores inflamatórios mostrou SCC25 pcDNA com aumento significativo na capacidade de invasão ($p=0,04$).
- II. Comparação SCC25 pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores inflamatórios mostrou aumento significativo de invasão nos tratamentos com IL-6 ($p=0,022$), TNF-a ($p=0,003$), TGF-beta-1 ($p=0,002$) e com os três mediadores ($p=0,05$).

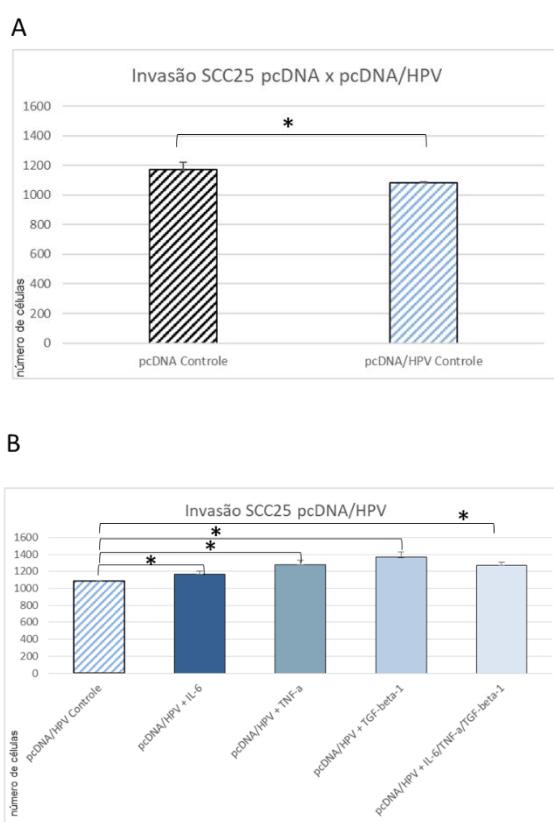


Figura 23. Ensaio de invasão com a linhagem SCC25. Gráfico com a média do número de células em cinco fotomicrografias de cada triplicata. **A.** Invasão de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. **B.** pcDNA/HPV tratado com os mediadores de inflamação. Dados são mostrados como a média das triplicatas \pm SD (desvio padrão) pelo teste ANOVA (* $p\leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Em resumo, a linhagem SCC25 contendo sequências virais mostraram redução de invasão quando comparadas ao controle contendo o vetor vazio. Um

resultado oposto foi observado em presença das sequências E6/E7: todos os tratamentos com mediadores de inflamação aumentaram a invasão.

Células HaCaT

Os resultados das comparações realizadas são apresentados abaixo e apresentados na Figura 24.

- I. Comparação HaCat pcDNA/HPV e pcDNA sem tratamento com mediadores inflamatórios mostrou pcDNA com diminuição na capacidade de invasão ($p=0,008$).
- II. Comparação HaCat pcDNA/HPV sem e com tratamento com mediadores inflamatórios mostrou aumento significativo na capacidade de invasão no tratamento com IL-6 ($p=0,04$) e TGF-beta-1 ($p=0,007$). Diminuição significativa na capacidade de invasão no tratamento com os três mediadores ($p=0,0001$).

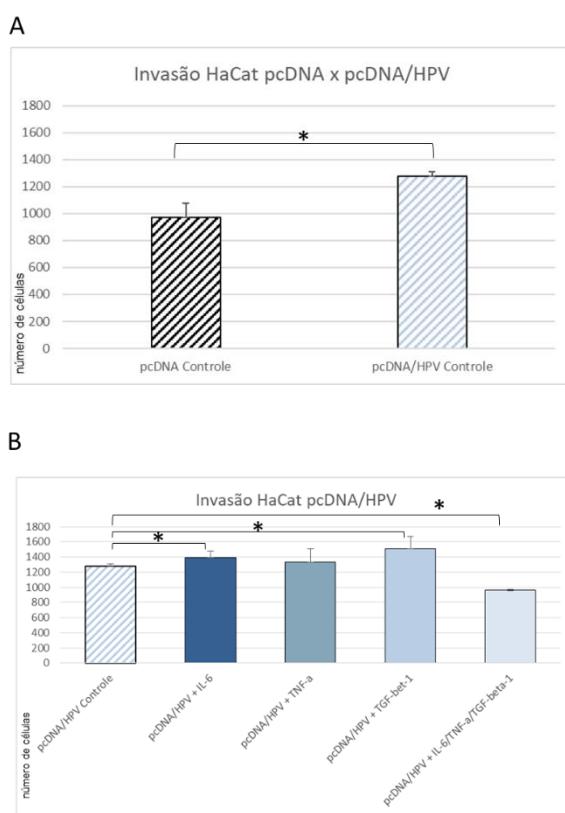


Figura 24. Ensaio de invasão da linhagem HaCat. Gráfico com a média do número de células em cinco fotomicrografias de cada triplicata. **A.** Invasão de pcDNA e pcDNA/HPV sem tratamento. **B.** pcDNA/HPV tratado com os mediadores de inflamação. Dados são mostrados como a média das triplicatas \pm SD (desvio padrão) pelo teste ANOVA (* $p \leq 0,05$). As comparações estão representadas por chaves na figura.

Em resumo, a presença de E6/E7 aumentou as taxas de invasão. O aumento na capacidade invasiva também foi observado nessas células tratadas com os mediadores de inflamação separadamente.

Avaliação da expressão de marcadores de EMT

Quantificação e avaliação da integridade do RNA das linhagens celulares

A extração de RNA por TRIzol e a síntese de cDNA foram realizadas com sucesso para as linhagens celulares HaCat, SCC25 e FaDu. A integridade e a qualidade do RNA mostraram-se excelentes, com valores de RIN (*RNA integrity number*) entre 9 e 9.5.

Seleção e desenho de iniciadores relacionados a transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Foram selecionados 50 genes a partir de extensa revisão bibliográfica sobre marcadores de EMT em câncer. A Tabela 1 apresenta os 50 genes selecionados e os iniciadores desenhados para sua amplificação.

Os genes selecionados foram analisados pela ferramenta STRING (*Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/Proteins*) e o resultado mostrou interações fortes entre os genes, exceto o SNAI3, que apresentou-se à parte dos demais (Figura 25).

Com o auxílio da ferramenta DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), os genes selecionados foram mapeados em vias metabólicas e processos biológicos. Dos 50 genes, 21 fazem parte da via do câncer e os demais foram ligados a vias específicas, também importantes para a tumorigênese e para EMT (Figura 26).

Em relação aos processos biológicos (Tabela 2), muitos genes mostraram envolvimento na regulação de transcrição e expressão gênica, processo de apoptose, proliferação celular, migração e transição epitélio-mesenquimal.

Tabela 1. Iniciadores para 50 genes relacionados a EMT e selecionados por revisão da literatura

Iniciadores	Sequência 5'-3 FORWARD REVERSE	Iniciadores	Sequência 5'-3 FORWARD REVERSE
<i>AKT1</i>	CATCACACCACCTGACCAAG CTGGCCGAGTAGGAGAACTG	<i>PTK2</i>	AACCAATGCATTCTGGAG TCCCATAAGCCCAGATTAC
<i>BMP7</i>	TCCGGTTGATCTTCCAAG ATCCGGAACGTCTCATTGTC	<i>RAC1</i>	CCCTTGCAAGGATGGAACTA ATGGCAATGTGACTGAAACA
<i>CDH1</i>	TGGAGAGACACTGCCAAGT CTCAAAATCCTCCCTGTCCA	<i>SERPINE1</i>	GTTCCCTGCCTTGCTGAGAC CCTGAAGCATCCCATCTGTT
<i>CDH2</i>	CCTGGAACGCACTGTACAGA TGGTTTGACCACGGTGACTA	<i>SMAD2</i>	ACGATTGGTGAAGGGGTGT GTTATTGCTGGGAAGCTGA
<i>CDH3</i>	GCGGAGACAGGGTATGAGTC AGTCAAACCTGCCAACATCC	<i>SNAI3</i>	AGCCCCAGGTGAAGACAGAGA TGTAGGCCATCTGTGAGGTG
<i>COL1A1</i>	TCGGGTTTCCACACGGTCTC AAGAGGAAGGCCAACGTCGAG	<i>SNAIL 2/SLUG</i>	GAGCATTGCAAGACAGGTCA TTGGAGCAGTTTGCACTG
<i>COL1A2</i>	GCGGTGGTGGTTATGACTTT GGGTCTGAGAGAACGGTCTG	<i>SNAIL1</i>	TGTCTGCGTGGGTTTTGTA GGAGCTTCCCAGTGAGCTG
<i>COL3A1</i>	CCAGGAGCTAACGGTCTCAG CAGGGTTTCCATCTCTTCCA	<i>SOX10</i>	ACACCAATCCCATCCACACT CCTCCCCAGGTTTCTCTGT
<i>COL5A2</i>	CGGGAACACCAGGAAAAGTA GGTTCCCCCTACAGGACCATT	<i>SOX2</i>	CTGGGCTCTGCCTTAAACAC GCCAAGACCCCTGAAATGAAA
<i>EGFR</i>	CCAGTGTGCCACTACATTG CTTCCAGAACCGGGTGTGTTG	<i>SPARC</i>	ATGGAGTTGACCTCGGAGTG TAGGCGCTCAGTCGTATCT
<i>ERBB3</i>	TGCAGTGGATTGAGAAGTG GGCAAACCTCCATCGTAGA	<i>STAT3</i>	ACCCCTCAGACCCCCAGTTCT CAGCTAAGGCTTGGGAAG
<i>FN1</i>	GATGCTCCACTAACCTCCA CGGTCACTCGGTATCCTGTT	<i>TGM2</i>	CCTGTGAGGAGGACGAACAT GGTTGAGGGTGTCTGAAGGA
<i>FOXC2</i>	GATCACCTGAACGGCATCT TTGACGAAGCACTCGTTGAG	<i>TGFB1</i>	ATCCAGGCAATTGAGACAG TCCAGAGTAGCTGGGACAC
<i>FZD7</i>	CCACAGACTTAGGCCACAGCA CTACCGTGCCTCTCCTCTTG	<i>TGFB2</i>	GCAGAGAGATGTTGCACCA GGGGCTACAGGGGATACTGT
<i>GSK3B</i>	AGCTTCAACTCCACCTGAA CGTGAACAGTGTGTTGAGT	<i>TGFB3</i>	CAGGGAGAAAATCCAGGTCA CAGGAGAGGGTTGATTCCA
<i>IL-6</i>	ATGCAATAACCACCCCTGAC AAAGCTGCGCAGAATGAGAT	<i>TIMP1</i>	TTTTAGAGCCTTGGAGGAG ACTGTTGGCTGTGAGGAATG
<i>ILK</i>	GCTCAGGATTTCTCGCATC TACGGCATCCAGTGTGTGAT	<i>TIMP2</i>	CTATATCCTTCTCAGGCCCTTG AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAAC
<i>ITGB1</i>	ATCCCAGAGGCTCAAAGAT CTGGCTTGAGCTTCTGT	<i>TNF</i>	TGTTCCCTCCACTACCCCTG CACAGTGGGTGGTCTGTTG
<i>JAG1</i>	AAGGGGTGCGGTATTTCC TCCCGTGAAGCCTTGTGAC	<i>TWIST 1</i>	CCACTGAAAGGAAAGGCATC GTTTGCAGGCCAGTTGAT
<i>MMP3</i>	TGAAAGAGACCCAGGGAGTG AGATGCCACTTGTGATGATG	<i>VCAN</i>	TCGGGAACCAAGATCTCTCAC TCTGTCGATGGTGTGGTGT
<i>MMP2</i>	CCGTCAAAGGGTATCCATC AACTCTGGAGCGATGTGACC	<i>VEGF</i>	GGCCCAAGCTGTAAGTTGGTA CCTAGCGGTTAGGGAAAC
<i>MMP9</i>	ATTCGACTCTCACGCATC TTGTGCTTCCCTGGAGAC	<i>VIM</i>	GAATATGGCTACCGCTTGC CACTCTCGTAGGAGCCCTG
<i>NF-κβ</i>	CTGGAAGCACGAATGACAG CCTTCTGCTGCAAATAGGCA	<i>WNT5A</i>	CAGGTTGCTCCTTCTCTG TGCAGGAGCTGAGAGTCAGA
<i>NOTCH1</i>	TCCTCCCTATGATGCCAGTC GTACTTGGCTCAGCCTCCAG	<i>ZEB1</i>	CAGGTTGCTCCTTCTCTG TGCAGGAGCTGAGAGTCAGA
<i>PDGFRB</i>	ATGTGGCTGCTATGGATT ACACTGGAGACGCCATATC	<i>ZEB2</i>	GACCTGGACGTGAAGGAAAA GGCACTTGCAGAAACACAGA

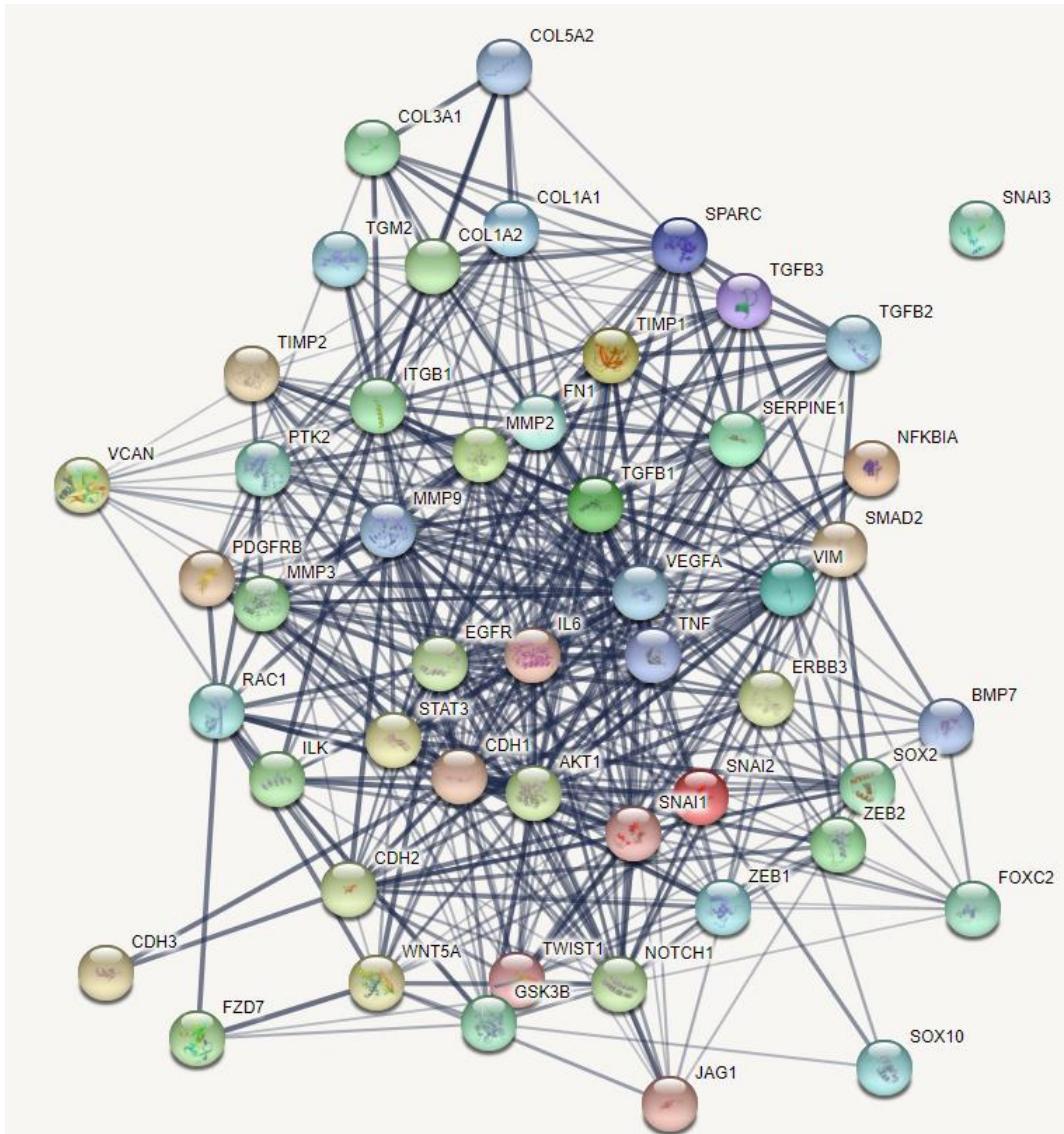


Figura 25. Análise das interações dos 50 genes relacionados com EMT pela ferramenta String. Quanto mais escuras e grossas as barras, maior a interação entre os genes.



Figura 26. Vias metabólicas nas quais os 50 genes selecionados foram mapeados pela ferramenta DAVID.

Tabela 2. Processos biológicos, elaborados pela ferramenta DAVID com dados do Gene Ontology, relacionados com os 50 genes selecionados para o trabalho

PROCESSOS BIOLÓGICOS	GENES
Regulação da transcrição	
Negativa - RNA polimerase	<i>FOXC2, NOTCH1, SOX2, SMAD2, SNAI2, SNAI1, STAT3, TGFB1, SNAI3, TNF, TWIST1, VEGFA, ZEB1, ZEB2</i>
Positiva - RNA polimerase	<i>AKT1, BMP7, EGFR, FOXC2, GSK3B, JAG1, IL6, NFKBIA, NOTCH1, SERPINE1, SOX2, SOX10, SMAD2, STAT3, TGFB1, TNF, TGFB3, TWIST1, VEGFA, WNT5A, ZEB2, ZEB1</i>
Positiva - DNA	<i>BMP7, CDH1, COL1A1, FOXC2, FZD7, IL6, ILK, NOTCH1, SMAD2, SNAI1, STAT3, SOX2, TNF, TGFB3, TGFB1, WNT5A</i>
Processo apoptótico	
Regulação negativa	<i>AKT1, EGFR, GSK3B, IL6, MMP9, NFKBIA, PDGFRB, PTK2, SOX10, STAT3, TGM2, TIMP1, TWIST1, VEGFA, WNT5A</i>
Regulação positiva	<i>AKT1, BMP7, IL6, ITGB1, NOTCH1, PDGFRB, RAC1, TNF, TGFB3, TGM2, TGFB1</i>
Proliferação celular	
Proliferação celular	<i>AKT1, EGFR, ILK, RAC1, STAT3, TGFB2, ZEB1</i>
Regulação negativa	<i>BMP7, IL6, NOTCH1, SMAD2, STAT3, TGFB3, TIMP2, TGFB1, TGFB2, ZEB1</i>
Regulação positiva	<i>EGFR, FN1, IL6, ILK, ITGB1, NOTCH1, PDGFR, PTK2, STAT3, TGFB1, TIMP1, TGFB2, VEGFA,</i> <i>EGFR, IL6, NOTCH1, TGFB1, TWIST1, VEGFA</i>
Regulação da proliferação epitelial	<i>ERBB3, JAG1, NFKBIA, PTK2, TNF, TGFB3</i>
Regulação da proliferação celular	<i>IL6, TGFB1, TGFB2, TGFB3</i>
Crescimento celular	
Organização da matriz extracelular	<i>CDH1, COL1A1, COL3A1, COL1A2, COL5A2, FN1, ITGB1, PTK2, SERPINE1, SPARC, TNF, VCAN</i>
Regulação positiva da expressão gênica	<i>CDH3, ERBB3, FN1, IL6, STAT3, TNF, TGFB1, TGFB2, TWIST1, VIM, VEGFA</i>
Migração celular	
Regulação da migração celular	<i>AKT1, JAG1, RAC1, TGFB1</i>
Regulação positiva	<i>COL1A1, EGFR, ILK, PDGFRB, PTK2, NOTCH1, SNAI2, SNAI1, TGFB1, VEGFA</i>
Migração celular	<i>CDH2, GSK3B, ITGB1, PDGFRB, SNAI1, TGFB1, TGFB2</i>
Transição epitélio-mesenquimal	
Regulação positiva	<i>COL1A1, NOTCH1, SMAD2, SNAI1, TGFB3, TGFB1, TGFB2, TWIST1</i>
Transição epitélio-mesenquimal	<i>BMP7, GSK3B, NOTCH1, SNAI2, SNAI1, TGFB1, TGFB2, WNT5A</i>
Via de sinalização do TGF-beta-1	<i>COL1A2, COL3A1, ITGB1, PTK2, SMAD2, TGFB3, TGFB1, TGFB2</i>
Regulação negativa da via Wnt	<i>CDH2, GSK3B, NOTCH1, SOX10, SOX2, SNAI2, WNT5A</i>
Angiogênese	<i>FN1, JAG1, MMP2, PTK2, SERPINE1, TGFB2, VEGFA</i>
Adesão celular	
Regulação positiva	<i>TGM2, TNF, VEGFA</i>
Adesão celular	<i>CDH2, CDH3, COL1A1, FN1, RAC1, VCAN</i>
Adesão matriz- célula	<i>COL3A1, ILK, ITGB1, RAC1</i>
Organização da junção célula-célula	<i>RAC1, TGFB3, TGFB1, TGFB2</i>
Organização das junções aderentes	<i>CDH1, CDH2, CDH3</i>
Regulação do formato celular	<i>FN1, IL6, PTK2, VEGFA</i>
Inflamação	
Resposta inflamatória	<i>AKT1, IL6, NFKBIA, RAC1, TNF, TGFB1</i>
Regulação positiva	<i>EGFR, SERPINE1, TGM2, WNT5A</i>
Cicatrização	<i>CDH3, COL3A1, EGFR, ERBB3, FN1, IL6, PDGFRB, SPARC, TGFB2, TGFB3, TIMP1, WNT5A</i>
Via de sinalização Wnt	<i>CDH3, FZD7, GSK3B, SNAI2, WNT5A</i>
Via de sinalização Notch	<i>FOXC2, JAG1, NOTCH1, SNAI2, TGFB1</i>
Regulação positiva do NF-kappaB	<i>IL6, NFKBIA, TGFB1, TNF, WNT5A</i>

Expressão dos genes relacionados a EMT

A análise de expressão dos 50 genes relacionados a EMT foi realizada nas linhagens SCC25, HaCat e FaDu, nas condições pcDNA (controle) e pcDNA/HPV com e sem tratamento com mediadores de inflamação. Os mediadores foram adicionados à cultura no seu início e sempre que o meio de cultivo foi substituído. Finalizado o experimento, o RNA foi extraído e a análise por PCR em tempo real foi realizada, conforme previamente descrito.

Os resultados mostraram diferença de expressão para muitos dos genes selecionados, especialmente no tratamento com os três moduladores. Na verdade, tanto nas células SCC25 como nas células HaCaT, na presença ou ausência do vetor com os genes E6/E7, o maior número de genes com valores de expressão significativamente aumentados ou reduzidos foi geralmente observado no tratamento com TNF- α e TGF- β ou com os três moduladores simultaneamente (Figuras 27 e 28, Tabelas 3 a 6). A análise do tratamento com moduladores evidenciou a importância de sua associação na indução da EMT, tanto em presença como em ausência de HPV.

A linhagem FaDu transfetada com E6/E7, ao contrário de SCC25 e HaCat, mostrou valores de expressão significativamente aumentados na presença de TNF- α e TGF-beta-1, bem como na presença dos três moduladores associados. As células pcDNA e pcDNA/HPV também mostraram um perfil de expressão diferente quando tratadas com IL-6: muitos genes com aumento ou diminuição de expressão na ausência ou presença de E6/E7, respectivamente (Figura 29, Tabelas 7 e 8).

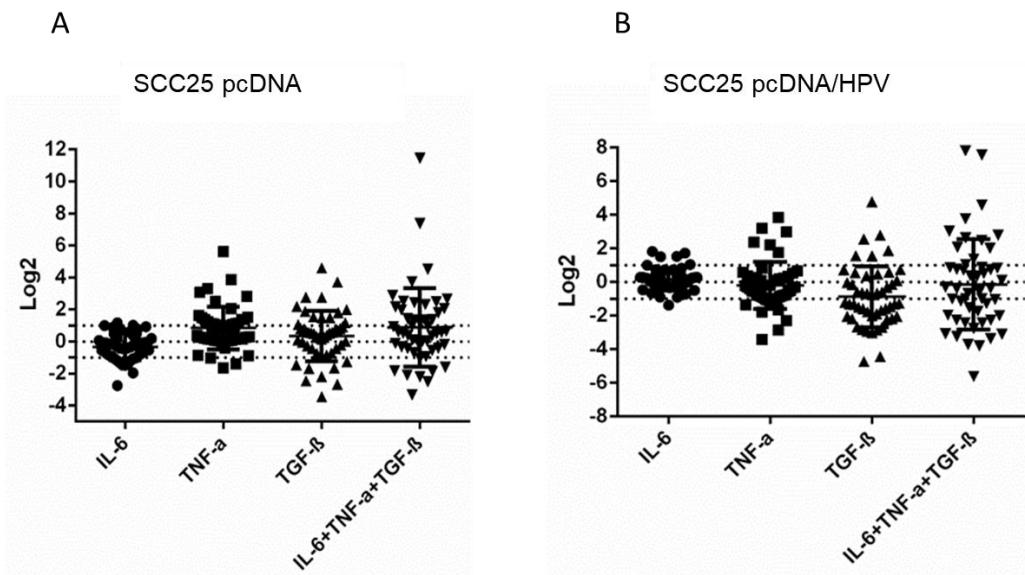


Figura 27. Valores de expressão relativa em logarítmico de base 2 dos genes relacionados a EMT.
A. Comparação da linhagem SCC25 pcDNA tratada com mediadores inflamatórios em relação às células sem tratamento (calibrador). **B.** Comparação da linhagem SCC25pcDNA/HPV tratada com mediadores inflamatórios em relação às células sem tratamento (calibrador). A linha pontilhada representa os valores acima de 1 ou -1.

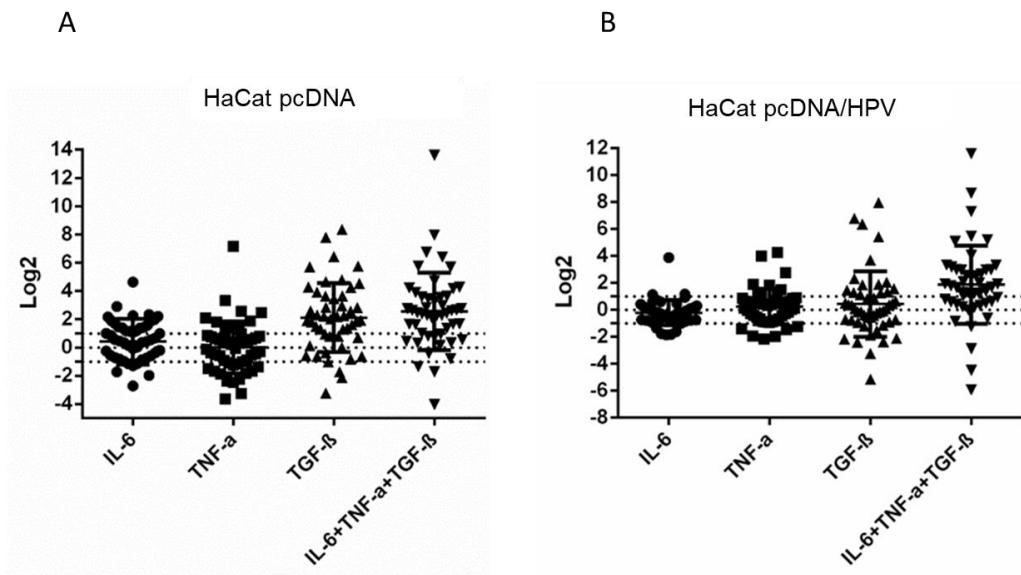


Figura 28. Valores de expressão relativa em logarítmico de base 2 dos genes relacionados a EMT.
A. Comparação da linhagem HaCat pcDNA tratada com mediadores inflamatórios em relação às células sem tratamento (calibrador). **B.** Comparação da linhagem HaCat pcDNA/HPV tratada com mediadores inflamatórios em relação às células sem tratamento (calibrador). A linha pontilhada representa os valores acima de 1 ou -1.

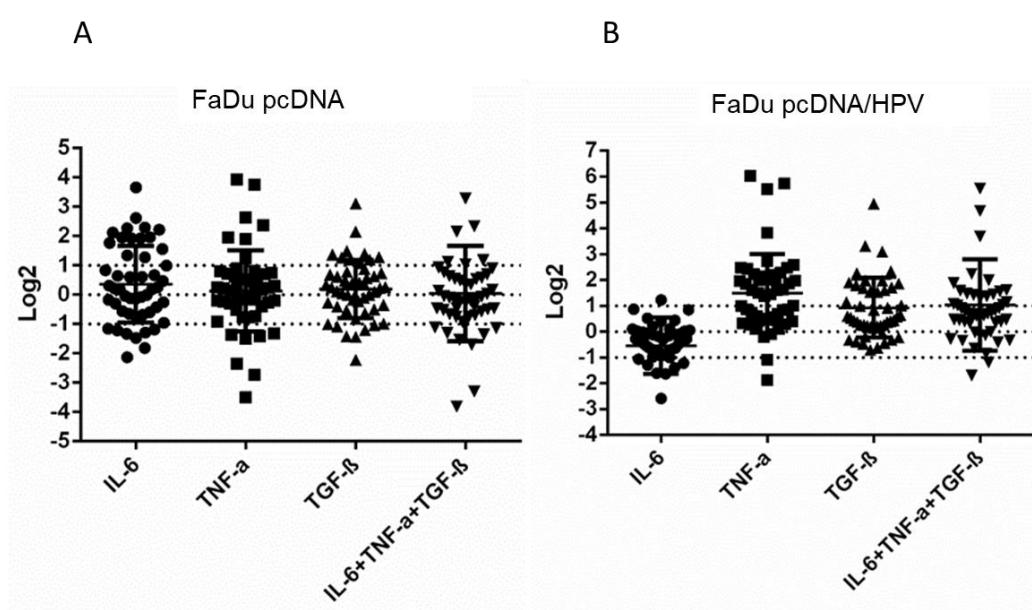


Figura 29. Valores de expressão relativa em logarítmico de base 2 dos genes relacionados a EMT.
A. Comparação da linhagem FaDu pcDNA tratada com mediadores inflamatórios em relação às células sem tratamento (calibrador). **B.** Comparação da linhagem FaDu pcDNA/HPV tratada com mediadores inflamatórios em relação às células sem tratamento (calibrador). A linha pontilhada representa os valores acima de 1 ou -1.

Tabela 3. Genes com expressão significativa (valores em log2) na linhagem SCC25 pcDNA tratada com IL-6, TNF-a, TGF-beta-1 ou com os três medicadores associados em relação a SCC25 pcDNA sem tratamento (calibrador)

Expressão	IL-6		TNF-a		TGF-beta-1		IL-6+TNF-a+TGF-beta-1	
	gene	log2	gene	log2	gene	log2	gene	log2
Elevada	SNAI2	1,009108	AKT1	1,133024	CDH2	2,751483	CDH1	2,949736
			BMP7	1,525426	COL1A1	2,764194	CDH2	2,869132
			CDH2	1,021114	COL1A2	1,488946	FN1	7,373756
			CDH3	1,362165	COL5A2	1,994728	IL6	1,338751
			FN1	3,876675	FN1	4,591006	ITGB1	1,164099
			ITGB1	1,37187	IL6	1,172743	JAG1	2,321533
			MMP9	5,611664	JAG1	1,871693	MMP2	2,16228
			PTK2	1,014676	MMP2	1,811185	MMP9	11,45982
			RAC1	1,617292	MMP9	3,72394	SERPINE1	3,73688
			SERPINE1	3,295614	SERPINE1	1,534313	SNAI1	1,365335
			SNAI1	1,059937	SNAI2	2,183937	SNAI2	2,662238
			SNAI2	1,376118	TGFB2	1,050515	SOX10	1,438564
			SOX10	1,093328	VIM	1,479548	SPARC	1,798142
			STAT3	1,160357			TGFB1	2,431588
			TGFB1	1,48519			TIMP1	2,478004
			TGFB2	2,512936			TIMP2	2,059996
			TGM2	2,043251			TNF	2,515481
			TIMP1	1,108779			VEGFA	1,3545
			TIMP2	1,220219			VIM	4,51015
			TNF	2,83271			ZEB1	1,980823
			VIM	3,060982				
Reduzida	MMP2	-1,20236	COL1A2	-1,39668	BMP7	-1,44429	BMP7	-3,33059
	NFKBIA	-1,45975	ERBB3	-1,03993	MMP3	-2,67544	MMP3	-2,10288
	NOTCH1	-1,06586	VCAN	-1,65291	NFKBIA	-1,6513	NOTCH1	-1,84044
	PDGFRB	-1,42585			NOTCH1	-2,18627	PDGFRB	-1,87577
	PTK2	-1,06588			PTK2	-1,68095	SMAD2	-1,04948
	RAC1	-1,02719			SMAD2	-2,45853	SNAI3	-1,60981
	SERPINE1	-2,75902			SNAI3	-3,45441	SOX2	-2,20814
	SMAD2	-1,19068			STAT3	-1,25	ZEB2	-2,5186
	SNAI3	-1,95524						
	SPARC	-1,48034						
	TIMP1	-1,31704						
	VIM	1,16988						

Tabela 4. Genes com expressão significativa (valores em log2) dn linhagem SCC25 pcDNA/HPV tratada com IL-6, TNF-a, TGF-beta-1 ou com os três mediadores associados em relação a SCC25 pcDNA/HPV sem tratamento (calibrador)

Expressão	IL-6		TNF-a		TGF-beta-1		IL-6+TNF-a+TGF-beta-1	
	gene	log2	gene	log2	gene	log2	gene	log2
Elevada	NOTCH1	1,532714	PTK2	1,764669	FN1	2,788002	CDH1	3,539025
	PDGFRB	1,003568	RAC1	2,982365	MMP9	2,569721	CDH2	2,014869
	RAC1	1,722294	SERPINE1	3,846933	PTK2	1,562469	FN1	4,574783
	SERPINE1	1,052182	SMAD2	2,212166	RAC1	1,555278	ITGB1	1,051874
	SNAI3	1,825738	SNAI3	2,372331	SERPINE1	4,782804	JAG1	2,077415
	SOX10	1,510151			SNAI3	1,868371	MMP2	2,487083
							MMP9	7,814249
							NOTCH1	1,369614
							PTK2	3,032049
							RAC1	2,629968
Reduzida	ILK	-1,36652	BMP7	-1,65495	BMP7	-2,92318	BMP7	-3,06894
			COL1A2	-1,16874	ERBB3	-1,21264	MMP3	-1,2772
			GSK3B	-1,05297	FOXC2	-1,26178	SNAI1	-2,41542
			MMP3	-3,41385	GSK3B	-1,57792	SOX2	-5,61362
			SOX2	-2,30141	IL6	-1,50086	SPARC	-1,98997
			TGFB3	-1,35878	ILK	-1,30075	STAT3	-3,23789
			TIMP1	-1,02917	MMP2	-1,68763	TGFB1	-2,42075
			TNF	-1,18289	MMP3	-4,72621	TGFB2	-1,9678
			VCAN	-2,86511	NFKB1A	-1,3193	TGFB3	-3,3631
			VEGFA	-1,7763	SNAI1	-1,88514	TGM2	-2,75436
Reduzida	WNT5A	-1,07642	SOX10	-1,32013	TIMP1	-2,18886	WNT5A	-3,71644
					SOX2	-4,43618	TIMP2	-1,13087
					STAT3	-2,04964	TNF	-1,73253
					TGFB1	-2,22687	TWIST1	-2,25945
					TGFB2	-1,77153	VCAN	-1,00294
					TGFB3	-2,6678	VEGFA	-2,26527
					TGM2	-2	VIM	-3,79057
					TIMP1	-2,18886	WNT5A	-3,71644
					TIMP2	-1,45508	ZEB1	-1,02932
					TNF	-3,0117	ZEB2	-1,52102
Reduzida					TWIST1	-2,18595		
					VCAN	-2,83307		
					VEGFA	-2,69378		
					VIM	-1,59425		
					WNT5A	-2,86158		
					ZEB2	-2,0401		

Tabela 5. Genes com expressão significativa (valores em log2) na linhagem HaCat pcDNA tratada com IL-6, TNF-a, TGF-beta-1 ou com os três mediadores associados em relação a HaCat pcDNA sem tratamento (calibrador)

Expressão	IL-6		TNF-a		TGF-beta-1		IL-6+TNF-a+TGF-beta-1	
	gene	log2	gene	log2	gene	log2	gene	log2
Elevada	<i>CDH1</i>	2,211013	<i>CDH1</i>	2,477256	<i>CDH1</i>	3,633141	<i>AKT1</i>	1,665223
	<i>CDH2</i>	1,175803	<i>CDH2</i>	2,553339	<i>CDH2</i>	5,765202	<i>CDH1</i>	3,639495
	<i>COL1A1</i>	1,878547	<i>COL1A1</i>	1,054344	<i>CDH3</i>	2,023053	<i>CDH2</i>	4,706223
	<i>MMP3</i>	1,151684	<i>FN1</i>	1,388705	<i>COL1A1</i>	8,355958	<i>CDH3</i>	2,262988
	<i>SNAI1</i>	2,255695	<i>MMP3</i>	2,094907	<i>FN1</i>	7,797286	<i>COL1A1</i>	5,690665
	<i>SNAI2</i>	1,40943	<i>MMP9</i>	7,155114	<i>FZD7</i>	1,495437	<i>FN1</i>	7,956232
	<i>SOX10</i>	2,346174	<i>RAC1</i>	1,796998	<i>GSK3B</i>	1,607578	<i>FZD7</i>	1,629318
	<i>SOX2</i>	1,696195	<i>SOX10</i>	1,528516	<i>ILK</i>	1,818448	<i>GSK3B</i>	2,384663
	<i>SPARC</i>	4,635197	<i>TNF</i>	3,319924	<i>ITGB1</i>	2,825621	<i>ILK</i>	2,750174
	<i>STAT3</i>	1,453784	<i>VEGFA</i>	1,86404	<i>JAG1</i>	1,925824	<i>ITGB1</i>	3,55996
	<i>TGFB1</i>	1,092703			<i>MMP2</i>	2,950668	<i>JAG1</i>	2,828519
	<i>TGFB3</i>	1,393258			<i>MMP3</i>	2,218787	<i>MMP2</i>	3,908206
	<i>TGM2</i>	1,899875			<i>MMP9</i>	6,437157	<i>MMP3</i>	3,266723
	<i>TIMP2</i>	1,014343			<i>SERPINE1</i>	5,711776	<i>MMP9</i>	13,61472
	<i>TNF</i>	2,161204			<i>SMAD2</i>	1,310162	<i>NFKBIA</i>	1,366007
	<i>TWIST1</i>	1,560184			<i>SNAI1</i>	3,923637	<i>PTK2</i>	1,676364
	<i>VCAN</i>	2,911423			<i>SNAI2</i>	4,281993	<i>RAC1</i>	2,433994
	<i>VEGFA</i>	1,441582			<i>SOX10</i>	2,304727	<i>SERPINE1</i>	6,736712
	<i>VIM</i>	1,178403			<i>SPARC</i>	4,790869	<i>SMAD2</i>	2,641682
	<i>ZEB1</i>	1,969553			<i>STAT3</i>	2,190605	<i>SNAI1</i>	6,406223
					<i>TGFB1</i>	1,379102	<i>SNAI2</i>	2,762372
					<i>TGFB2</i>	3,65085	<i>SOX10</i>	1,029446
					<i>TGFB3</i>	1,904885	<i>SPARC</i>	4,227486
					<i>TGM2</i>	2,853034	<i>STAT3</i>	1,6649
					<i>TIMP1</i>	2,254848	<i>TGFB2</i>	2,656295
					<i>TIMP2</i>	2,587839	<i>TGFB3</i>	2,078064
					<i>TWIST1</i>	1,847453	<i>TGM2</i>	2,981407
					<i>VCAN</i>	4,546337	<i>TIMP1</i>	2,279321
					<i>VEGFA</i>	2,573481	<i>TIMP2</i>	2,472837
					<i>VIM</i>	4,261949	<i>TNF</i>	5,751401
					<i>WNT5A</i>	4,670581	<i>VCAN</i>	2,273123
					<i>ZEB1</i>	3,456544	<i>VEGFA</i>	4,167912
					<i>ZEB2</i>	1,290199	<i>VIM</i>	4,265217
							<i>WNT5A</i>	3,46829
							<i>ZEB1</i>	3,58707
							<i>ZEB2</i>	2,605551
Reduzida	<i>BMP7</i>	-1,13238	<i>BMP7</i>	-3,24342	<i>BMP7</i>	-3,211	<i>BMP7</i>	-4,02528
	<i>EGFR</i>	-1,71432	<i>COL5A2</i>	-1,66202	<i>NOTCH1</i>	-2,1066	<i>NOTCH1</i>	-1,71054

Continuação

Continuação

<i>ILK</i>	-2,71047	<i>EGFR</i>	-1,23041	<i>SOX2</i>	-1,72012	<i>SOX2</i>	-1,34925
<i>MMP9</i>	-5,2052	<i>MMP2</i>	-1,34462				
<i>NOTCH1</i>	-1,13977	<i>NOTCH1</i>	-1,67377				
<i>PTK2</i>	-1,28019	<i>PDGFRB</i>	-2,25533				
<i>SNAI3</i>	-1,97061	<i>SNAI3</i>	-3,62757				
		<i>SOX2</i>	-1,8197				
		<i>STAT3</i>	-1,18095				
		<i>TGFB1</i>	-1,86061				
		<i>TGFB3</i>	-1,47655				
		<i>TIMP1</i>	-2,37519				
		<i>TIMP2</i>	-1,0839				
		<i>VIM</i>	-2,47758				

Tabela 6. Genes com expressão significativa (valores em log2) na linhagem HaCat pcDNA/HPV tratada com IL-6, TNF-a, TGF-beta-1 ou com os três mediadores associados em relação a HaCat pcDNA/HPV sem tratamento (calibrador)

Expressão	IL-6		TNF-a		TGF-beta-1		IL-6+TNF-a+TGF-beta-1	
	gene	log2	gene	log2	gene	log2	gene	log2
Elevada	SOX10	3,890451	CDH1	1,121115	CDH1	1,581448	AKT1	1,281491
	SOX2	1,171638	<i>IL6</i>	1,844477	CDH2	1,895093	CDH1	1,3166
	VEGFA	1,146722	MMP9	2,776858	CDH3	2,32795	CDH2	2,55356
			SOX10	4,271603	COL1A1	1,86438	CDH3	1,935471
			STAT3	1,893146	FN1	5,433198	COL1A1	1,046305
			<i>TGFB2</i>	1,137243	<i>IL6</i>	1,323732	COL1A2	1,785399
			<i>TIMP1</i>	1,27497	<i>ITGB1</i>	2,064929	FN1	7,312496
			<i>TNF</i>	4,004443	JAG1	1,263644	<i>IL6</i>	2,957184
			VCAN	1,493745	MMP2	3,70428	<i>ILK</i>	1,222066
					MMP9	6,784286	<i>ITGB1</i>	2,975246
					SERPINE1	7,951391	JAG1	2,015132
					SNAI2	1,462224	MMP2	3,323111
					SOX10	6,376459	MMP3	2,097455
					VIM	1,284983	MMP9	11,60803
					WNT5A	1,135517	PTK2	1,694412
							RAC1	1,651384
							SERPINE1	8,681353
							SMAD2	1,927666
							SNAI1	3,191349
							SNAI2	2,984921
							SOX10	5,469009
Reduzida	FZD7	-1,80158	BMP7	-1,97824	BMP7	-2,38703	BMP7	-5,92978
			PDGFRB	-1,83842	EGFR	-2,16803	COL5A2	-2,87394
			SMAD2	-1,60003	JAG1	-1,92715	EGFR	-3,22905
			SNAI3	-1,75327	NOTCH1	-1,48148	MMP3	-2,10298
			<i>TIMP1</i>	-1,347	SMAD2	-1,23313	NFKB1A	-1,12712
					SOX2	-1,40156	NOTCH1	-2,36249
							SOX2	-5,1456
							ZEB1	3,335587

Continuação

Continuação

<i>SPARC</i>	-1,5449
<i>TGFB3</i>	-1,87148
<i>TIMP2</i>	-2,15643

Tabela 7. Genes com expressão significativa (valores em log2) na linhagem FaDu pcDNA tratada com IL-6, TNF-a, TGF-beta-1 ou com os três mediadores associados em relação a FaDu pcDNA sem tratamento (calibrador)

Expressão	IL-6		TNF-a		TGF-beta-1		IL-6+TNF-a+TGF-beta-1	
	gene	log2	gene	log2	gene	log2	gene	log2
Elevada	SNAI1	1,92582	IL6	1,948294	CDH2	1,280965	MMP9	7,455555
	SNAI2	1,774775	MMP3	1,891828	ERBB3	1,197802	SERPINE1	2,339629
	SOX2	2,220382	MMP9	3,940629	MMP9	2,15735	TNF	3,289952
	SPARC	2,623297	TNF	3,754079	SNAI1	1,39265	VEGFA	1,122355
	STAT3	1,342768	VEGFA	2,370401	SNAI2	1,271227	VIM	2,156931
	TGFB2	2,116891	VIM	2,638532	TGFB2	1,198334	ZEB1	1,036992
	TGFB3	1,562381	ZEB2	1,254016	TWIST1	1,369679	ZEB2	1,179419
	TIMP1	1,929821			VCAN	1,086433		
	TIMP2	1,275394			VIM	3,110942		
	TWIST1	1,961947			ZEB2	1,483797		
	VCAN	2,299823						
	VEGFA	2,271296						
	VIM	3,659944						
	ZEB2	1,957146						
Reduzida	MMP2	-2,1273	COL1A2	-2,34279	PTK2	-1,43926	NOTCH1	-1,11622
	MMP3	-1,33258	COL5A2	-1,36583	SNAI3	-2,2231	SOX10	-3,81323
	MMP9	-1,18119	NOTCH1	-2,73941	SOX10	-1,00519	SOX2	-3,29676
	NOTCH1	-1,2108	SOX10	-3,50456	SOX2	-1,04112	SPARC	-1,30075
	RAC1	-1,15505	SOX2	-1,41189	SPARC	-1,20367	STAT3	-1,14004
	SERPINE1	-1,80892	SPARC	-1,31694	TGFB1	-1,42496	TGFB2	-1,35505
	SMAD2	-1,47247	WNT5A	-1,50266	TGM2	-1,0874	TGFB3	-1,53552
	SNAI3	-1,28355					TIMP1	-1,70353

Tabela 8. Genes com expressão significativa (valores em log2) na linhagem FaDu pcDNA/HPV tratada com IL-6, TNF-a, TGF-beta-1 ou com os três mediadores associados em relação a FaDu pcDNA/HPV sem tratamento (calibrador)

Expressão	IL-6		TNF-a		TGF-beta-1		IL-6+TNF-a+TGF-beta-1	
	gene	log2	gene	log2	gene	log2	gene	log2
Elevada	MMP2	1,233238	<i>IL6</i>	1,962358	MMP2	1,858212	CDH2	1,069257
			<i>ITGB1</i>	1,369642	MMP9	3,099018	<i>IL6</i>	1,418715
			MMP2	1,873156	<i>SERPINE1</i>	1,705896	MMP2	2,241776
			MMP3	1,999241	<i>SNAI1</i>	1,895739	MMP9	9,358224
			MMP9	6,02565	SOX10	1,674821	<i>SERPINE1</i>	3,684415
			<i>NFKBIA</i>	1,619398	SOX2	1,605625	SMAD2	1,034096
			<i>SERPINE1</i>	2,145003	SPARC	3,322536	<i>SNAI3</i>	1,558142
			SMAD2	1,844694	STAT3	1,985821	<i>SNAI1</i>	1,303991
			<i>SNAI1</i>	1,453181	<i>TGFB1</i>	2,266779	<i>SNAI2</i>	1,478149
			<i>SNAI2</i>	2,472854	<i>TGFB2</i>	2,267398	SOX10	1,591132
			SOX10	2,470499	<i>TGFB3</i>	1,968235	SPARC	1,022856
			SOX2	1,616115	<i>TGM2</i>	1,543823	<i>TGFB1</i>	1,618905
			SPARC	3,830597	<i>TIMP1</i>	2,340811	<i>TGFB2</i>	1,145741
			<i>TGFB1</i>	2,236033	<i>TIMP2</i>	1,802228	<i>TIMP1</i>	1,362642
			<i>TGFB2</i>	2,721853	VCAN	2,20388	TNF	5,542373
			<i>TGFB3</i>	1,975957	VEGFA	1,010671	VCAN	1,450336
			<i>TGM2</i>	2,036442	VIM	4,947272	VIM	4,673248
			<i>TIMP1</i>	2,282913	WNT5A	1,53525	<i>ZEB1</i>	1,990836
			<i>TIMP2</i>	2,587592	<i>ZEB1</i>	1,139873	<i>ZEB2</i>	1,880234
			TNF	5,728461				
			VCAN	2,189151				
			VEGFA	1,618014				
			VIM	5,516342				
			WNT5A	1,496232				
			<i>ZEB1</i>	2,443985				
			<i>ZEB2</i>	1,990442				
Reduzida	PTK2	-1,60471	PDGFRB	-1,87146			CDH1	-1,69608
	RAC1	-1,22042	STAT3	-1,08078			FOXC2	-1,19325
			SNAI3	-1,38788				
			SOX10	-6,29333				
			STAT3	-1,28967				
			<i>TIMP2</i>	-1,06257				
			VEGFA	-2,58301				
			<i>ZEB2</i>	-1,62901				

DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é um grupo de neoplasias observado geralmente no contexto de inflamação crônica e que apresenta entre seus fatores etiológicos a infecção por HPV.

Em uma infecção persistente, o HPV precisa bloquear uma resposta imune efetiva contra ele. Esse bloqueio é traduzido em regulação de moléculas presentes na superfície de células do sistema imune ou de moléculas solúveis indutoras de proliferação (Woodby *et al.*, 2016). Apesar de ser imunossupressora, a infecção por HPV é também moderadamente inflamatória e, no caso de carcinoma de colo de útero, essa inflamação aumenta durante a progressão das lesões (Castle *et al.*, 2001). Portanto, o vírus precisa suprimir a resposta imune, mas provavelmente desfruta das atividades de proliferação desencadeadas pelo hospedeiro (Woodby *et al.*, 2016).

No presente estudo, as sequências virais E6 e E7 associadas à transformação celular foram inseridas em células de duas linhagens de CECP originalmente não infectadas por HPV e de uma linhagem de queratinócitos normais, que foram posteriormente tratadas com mediadores de inflamação. Assim, foi criado *in vitro* um ambiente com algumas das características do processo inflamatório que ocorre *in vivo*, e nesse ambiente foi avaliado o comportamento de células neoplásicas e normais contendo sequências virais. Os principais parâmetros observados foram alterações de morfologia, proliferação, viabilidade, comportamento migratório e invasivo e perfil de expressão de genes associados à transição epitelio-mesenquimal, que é um conjunto de eventos ligados à progressão neoplásica.

A presença das sequências E6/E7 aparentemente induziu a formação de ilhas com densidade celular elevada na cultura de queratinócitos normais (HaCat) e uma mudança de morfologia das células de carcinoma oral (SCC25), com a aquisição de um aspecto intermediário entre o epitelial e o fibroblastóide. Achados similares não foram observados na linhagem de carcinoma de hipofaringe (FaDu).

As células SCC25 contendo sequências virais mostraram aumento de proliferação e viabilidade quando comparadas ao controle contendo o vetor vazio, mas exibiram redução de ambos os parâmetros quando tratadas com todas os mediadores de inflamação simultaneamente ou com cada um deles, exceto com IL-6.

Os queratinócitos normais transfectados com sequências virais mostraram um padrão um pouco diferente, com redução de proliferação e viabilidade quando comparados com o controle contendo o vetor vazio e na maioria dos tratamentos com mediadores de inflamação, exceto no caso de IL-6 ou TNF-a. De acordo com os dados da literatura, seria esperado aumento de proliferação em presença dos genes virais E6 e E7, considerando a inibição de p53 por E6 e de pRB por E7 (Moody e Laimins, 2010). Entretanto, o estudo de Kaczkowski e col. (2012) (Kaczkowski *et al.*, 2012) também detectou crescimento e viabilidade reduzidos em células HaCaT transfectadas com genomas de HPV11, 16 e 45 em comparação com seu controle contendo o vetor vazio. Os autores concluíram que essa redução do crescimento pode ser resultado da ativação do programa de apoptose celular em resposta à infecção viral.

Os dados acima sugerem que as sequências E6/E7 do HPV 16 aumentam a proliferação e a viabilidade de células já neoplásicas, mas não de células normais na condição *in vitro*. Os mediadores de inflamação parecem levar à redução de ambos os parâmetros nos dois tipos celulares. Um destaque deve ser feito para a IL-6 que, ao contrário dos outros mediadores, induziu proliferação e aumentou viabilidade. Este resultado é explicado pelo fato da IL-6, após ligação com seu receptor, ativar vias de sinalização - JAK/STAT, PI3K/AKT e Ras/MAPK – que regulam proliferação, como referido por vários autores (Ataie-Kachoie *et al.*, 2014; Eichten *et al.*, 2016; Jones e Jenkins, 2018). IL-6 também pode ativar a via do receptor do fator de crescimento epidérmico EGFR e a via STAT3 independente da quinase Src (Stabile *et al.*, 2017).

Existem evidências da literatura mostrando o papel oncogênico de IL-6 em diversos tipos de câncer (Guo *et al.*, 2012; Nagasaki *et al.*, 2014; Rodon *et al.*, 2014). Em CECP, níveis elevados de IL-6 no soro têm sido associados com prognóstico sombrio (Guo *et al.*, 2012), enquanto níveis baixos foram relacionados com doença estável e maior sobrevida global (Stabile *et al.*, 2017).

Níveis baixos de transcritos da IL-6 também foram observados em pacientes HPV positivos que, de acordo com a literatura (Fung *et al.*, 2017), possuem melhor prognóstico. Segundo Guerrera e col. (2014), a regulação de IL-6 é provavelmente modulada pelas proteínas E6 e E7 e pode contribuir para o escape à resposta imune em pacientes HPV positivos (Guerrera *et al.*, 2014).

Yadav e col. (2011) observaram em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço a indução de EMT por IL-6 via STAT3/SNAIL (Yadav *et al.*, 2011). O mesmo

efeito foi identificado por Shen e col. (2017) (Shen *et al.*, 2017) em células de carcinoma colorretal, um efeito que foi revertido por inibidores de IL-6 (Gyamfi *et al.*, 2018). Entretanto, esse resultado não é restrito a IL-6, tendo sido detectado em linhagens celulares de diversos tipos de carcinoma por ação de ligantes TGF-betas e BMPs via SMADs (Ramachandran *et al.*, 2018).

A IL-6 é considerada um potencial biomarcador de resistência a drogas (Stanam *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016). A ativação da via IL6/JAK/STAT3 por um mecanismo de *feedback* tem sido referida para explicar a falha em resgatar pacientes com CECP que mostraram resistência à terapia (Sen *et al.*, 2009). Yun e col. (2018) (Yun *et al.*, 2018) propuseram outro *feedback* IL-6/MAPK/ERK, que resulta na resistência a inibidores de PI3K em células de CECP.

Em relação a comportamento migratório e invasividade, as células neoplásicas SCC25 contendo sequências virais mostraram redução de migração quando comparadas ao controle contendo o vetor vazio. Estas células, bem como as normais, também exibiram um efeito moderado na redução de migração em alguns tratamentos com mediadores de inflamação. Em relação à característica de invasividade de células normais ou neoplásicas transfectadas com sequências E6/E7, a maioria dos tratamentos com mediadores de inflamação aumentou as taxas de invasão. Estes achados sugerem a participação do ambiente inflamatório na capacidade invasiva/metastática de CECP em presença de infecção por HPV, o que poderia explicar em parte o fato dos portadores de tumores HPV positivos terem uma doença avançada ao diagnóstico do ponto de vista de metástases linfonodais (Buckley *et al.*, 2018).

No presente trabalho, a análise de expressão de transcritos focou genes relacionados com a transição epitélio-mesenquimal. Pela ferramenta String, os genes selecionados mostram fortes interações, exceto o SNAI3 que também exibiu um perfil de expressão distinto dos demais marcadores de EMT. A ferramenta DAVID identificou as vias metabólicas deste conjunto de genes, incluindo as vias de mediadores de inflamação TNF-a e TGF-beta (Balkwill, 2009; Ikushima e Miyazono, 2010) e a via de sinalização de quinases Hippo (Harvey *et al.*, 2013), além de suas conexões com efetores MAPK, PI3K-AKT, beta-catenina, SMADs, TCF/LEF, já citados previamente. Muitos processos biológicos estão relacionados a estas vias. Além da transição epitélio-mesenquimal, que foi o termo utilizado para seleção desses genes, os processos ligados aos genes selecionados compreendem regulação de expressão

gênica, apoptose, proliferação, organização de matriz extracelular, migração, adesão, inflamação, entre outros.

Na análise geral de expressão de transcritos, pode ser observado que as células SCC25 mostraram um grande número de genes com aumento/diminuição de expressão principalmente nos tratamentos com TNF-a, TGF-beta e com os três mediadores de inflamação simultaneamente, independentemente do status HPV. O menor efeito foi observado em presença de IL-6. Resultados similares foram observados para a HaCaT, mas diferiram bastante dos obtidos para a linhagem FaDu. Esta última mostrou principalmente genes com aumento de expressão em presença de sequências E6/E7 nos tratamentos com TNF-a, TGF-beta e com os três mediadores de inflamação simultaneamente. O tratamento com IL-6 induziu a expressão em muitos genes na condição vetor vazio e diminuição de expressão na presença de E6/E7. Confirmando o que foi observado em proliferação e viabilidade, o efeito da IL-6 no padrão de expressão dos genes selecionados diferiu do efeito de outros mediadores nas células estudadas.

Na análise específica dos resultados de PCR em tempo real, foi observado que o tratamento das células controles SCC25 com mediadores de inflamação resultou em elevação de genes envolvidos em EMT - *SNAI1*, *SNAI2*, *VIM*, *ZEB1*, e a redução de expressão de outros genes destas famílias (*SNAI3*, *ZEB2*). Essas células, com os mesmos tratamentos e na presença das sequências virais, mostraram redução de expressão de *SNAI1*, *TWIST1*, *VIM*, *ZEB1*, *ZEB2* e de muitos outros genes envolvidos em EMT (*BMP7*, *GSK3B*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *WNT5A*) e resposta inflamatória (*IL6*, *NFKBIA*, *TNF*, *TGFB1*, *TGM2*, *WNT5A*), sugerindo que a infecção pelo vírus em células neoplásicas da cavidade oral podem restringir a resposta inflamatória e EMT. Nestas células, a redução de expressão de genes relacionados com migração (*GSK3B*, *ILK*, *SNAI1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *VEGFA*) e aumento de expressão de E-caderina (*CDH1*) concordam com os resultados dos estudos funcionais obtidos pelo presente trabalho, que não identificaram um efeito relevante em migração na presença de mediadores de inflamação e na presença/ausência de E6/E7. Diferentemente, Cohen e col. (2015) (Cohen et al., 2015), após tratamento de células de câncer de mama com IL-6, TNF- α e TGF- β , observaram aumento de migração, mesmo na presença de níveis altos de E-caderina.

O tratamento das células controles FaDu com mediadores de inflamação resultou em elevação de *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *VIM*, *ZEB1*, *ZEB2*, concordando

com os resultados de Yu e col. (2013) (Yu *et al.*, 2014), que também observaram indução de marcadores de EMT, como *VIM*, em FaDu tratadas com TNF-a. Com os diferentes tratamentos, mas na presença das sequências virais, as células FaDu mostraram aumento de expressão de muitos genes envolvidos em EMT (*SMAD2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VIM*, *ZEB1*, *ZEB2*, *WNT5A*), resposta inflamatória (*IL6*, *NFKBIA*, *SERPINE1*, *TGFB1*, *TGM2*, *TNF*, *WNT5A*) e migração (*CDH2*, *ITGB1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *VEGFA*), sugerindo que a infecção pelo vírus em células neoplásicas da hipofaringe, ao contrário de cavidade oral, deve induzir resposta inflamatória e EMT. Realmente, já foram identificados em amostras de tumores primários de cabeça e pescoço por técnicas imuno-histoquímicas a associação de infecção por HPV e fenótipo EMT (positividade para vimentina e/ou redução de E-caderina) (Hatakeyama *et al.*, 2014; Wakisaka *et al.*, 2015).

O perfil de expressão dos queratinócitos normais HaCat controles ou em presença de E6/E7 tratados com mediadores de inflamação foi similar ao observado nas células FaDu, com aumento de níveis de transcritos envolvidos em EMT, resposta inflamatória e migração, o que está de acordo novamente com os ensaios funcionais realizados.

Esses resultados obtidos em FaDu e HaCat são semelhantes ao padrão observado em células de câncer de pulmão transfetadas com E6 e E7 de HPV 16, um padrão que incluiu alterações morfológicas do tipo EMT, níveis reduzidos de marcadores epiteliais e níveis aumentados de marcadores mesenquimais e de transcritos dos genes *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* e *ZEB1* (Liu *et al.*, 2018).

A análise de expressão gênica em SCC25, FaDu e HaCat sugere, portanto, que a indução da transição epitélio-mesenquimal em presença de processos inflamatórios parece ser dependente do sítio anatômico de origem e, consequentemente, das características intrínsecas das células analisadas. A reprogramação de vias metabólicas de uma célula durante o processo de transformação neoplásica provavelmente segue o perfil observado no tecido normal de origem (Hu *et al.*, 2013), embora cada situação deva ser influenciada pelas demandas impostas por mutações ligadas à tumorigênese (Kim *et al.*, 2018).

Puram e col. (2017) (Puram *et al.*, 2017), na análise do transcriptoma de célula única de CECPs primários, obtiveram resultados que indicam a existência de um processo EMT parcial (p-EMT), com regulação positiva de certos genes mesenquimais e moderação do programa epitelial. Os autores propõem um *continuum*

de etapas para a p-EMT, o que permite explicar fenótipos com capacidade invasiva, mas não migratória, e com expressão parcial do conjunto de marcadores de EMT. Realmente, alguns autores não observaram associação significativa entre EMT e status HPV (Lefevre *et al.*, 2017), como foi visto nas células SCC25/HPV no presente estudo.

Como revisto por Tanaka e col. (2018) (Tanaka e Alawi, 2018), a infecção por HPV é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de orofaringe, cuja incidência tem aumentado significativamente nas últimas duas décadas. A preferência do vírus pela orofaringe ainda não está bem esclarecida, mas há a sugestão de que o epitélio das criptas tonsilares é mais suscetível para infecções HPV transformantes (Leemans *et al.*, 2018). Esta susceptibilidade pode ser decorrente do fato do epitélio das tonsilas palatinas (e da língua) possuir expressão elevada de PD-1 (*programmed cell death protein 1*), uma proteína de superfície da família das imunoglobulinas que suprime a resposta da célula T ao HPV e cria um sítio favorável para infecção e propagação viral (Tanaka e Alawi, 2018). Recentemente, terapia com alvo em PD1 – PD1 ligante foi aprovada para CECP (Havel *et al.*, 2019).

A importância do presente trabalho foi a análise das relações entre HPV, EMT e inflamação nos tumores de cabeça e pescoço com resultados mostrando respostas celulares diferentes à presença de sequências virais e a importância do ambiente inflamatório no tipo destas respostas em células neoplásicas de subsítios anatômicos distintos. Os resultados abrem perspectivas de estudo sobre a transição epitelio-mesenquimal parcial durante a progressão tumoral.

CONCLUSÃO

- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 modifica a morfologia de linhagens de queratinócitos normais e de células de carcinoma oral.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 induzem aumento de proliferação e viabilidade em células de carcinoma oral e efeito inverso quando também tratadas com os mediadores de inflamação IL-6, TNF-a, TGF-beta simultaneamente ou com cada um deles, exceto com IL-6.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 induzem redução de proliferação e viabilidade em queratinócitos normais e os tratamentos com mediadores de inflamação, exceto com IL-6 ou TNF-a, não modificam os efeitos das sequências virais.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 reduz o comportamento migratório da linhagem SCC25 na ausência ou na presença de mediadores de inflamação.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 reduz o comportamento migratório de queratinócitos normais na presença de mediadores de inflamação.
- Os tratamentos com mediadores de inflamação aumentaram as taxas de invasão em células SCC25 na presença das sequências E6/E7 do HPV 16.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 aumentou as taxas de invasão em queratinócitos normais na ausência ou na presença de tratamento com os mediadores de inflamação IL-6, TNF-a, TGF-beta isoladamente.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 em associação ou não com mediadores de inflamação reduz a expressão de marcadores de EMT, migração e resposta inflamatória em células neoplásicas da cavidade oral.
- A presença das sequências E6/E7 do HPV 16 em associação ou não com mediadores de inflamação induz a expressão de marcadores de EMT, migração e resposta inflamatória em células neoplásicas da hipofaringe e em queratinócitos normais.
- O efeito da citocina IL-6 no padrão de expressão dos marcadores de EMT diferiu do efeito de outros mediadores de inflamação nas células estudadas.

- Os resultados do presente trabalho sugerem que a infecção pelo vírus em células neoplásicas da hipofaringe, ao contrário de cavidade oral, induzem uma resposta inflamatória e EMT.
- A indução da transição epitélio-mesenquimal em presença de processos inflamatórios parece ser dependente do sítio anatômico de origem e, consequentemente, das características intrínsecas das células analisadas.
- A identificação de fenótipos com capacidade invasiva, mas não migratória, e com expressão parcial do conjunto de marcadores de EMT pode representar transição epitélio-mesenquimal parcial.
- Mediadores inflamatórios provavelmente aumentam a capacidade invasiva/metastática de CECP em presença de infecção por HPV.

REFERÊNCIAS

- ATAIE-KACHOIE, P. et al. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). **J Clin Pathol**, v. 67, n. 11, p. 932-7, Nov 2014. ISSN 1472-4146 (Electronic)
0021-9746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031389> >.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-71, May 2009. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343034> >.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, Feb 17 2001. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684> >.
- BARBOSA LNF, S. D., AMARAL MXA, GONÇALVES AJ, BRUSCAT WL. Repercussões psicossociais em pacientes submetidos a laringectomia total por câncer de laringe: um estudo clínico-qualitativo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 3, p. 45-58, 2004.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 25 2010. ISSN 1096-0341 (Electronic)
0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206957> >.
- BERRAONDO, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **Br J Cancer**, v. 120, n. 1, p. 6-15, Jan 2019. ISSN 1532-1827 (Electronic)
0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30413827> >.
- BLAST. 2019. Disponível em: < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >.
- BLAT. in-silico PCR 2019. Disponível em: < <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> >.
- BUCKLEY, L. et al. HPV-related Oropharyngeal Carcinoma: A Review of Clinical and Pathologic Features With Emphasis on Updates in Clinical and Pathologic Staging. **Adv Anat Pathol**, v. 25, n. 3, p. 180-188, May 2018. ISSN 1533-4031 (Electronic)
1072-4109 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29394171> >.
- CASTELLSAGUE, X. et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. **J Natl Cancer Inst**, v. 108, n. 6, p. djv403, Jun 2016. ISSN 1460-2105 (Electronic)
0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823521> >.
- CASTLE, P. E. et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 10, p. 1021-7, Oct 2001. ISSN 1055-9965 (Print)

1055-9965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588127> >.

COHEN, E. N. et al. Inflammation Mediated Metastasis: Immune Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Inflammatory Breast Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132710, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26207636> >.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490959> >.

CROWE, S. E. Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 21, n. 1, p. 32-8, Jan 2005. ISSN 0267-1379 (Print)

0267-1379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15687882> >.

DASGUPTA, S. et al. Identification of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 3, p. 306-16, Mar 2006. ISSN 1368-8375 (Print)

1368-8375 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321566> >.

DE MARTEL, C.; FRANCESCHI, S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 70, n. 3, p. 183-94, Jun 2009. ISSN 1879-0461 (Electronic)

1040-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805702> >.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 20 2004. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049> >.

DONG, W. et al. Exposure to TNFalpha combined with TGFbeta induces carcinogenesis in vitro via NF-kappaB/Twist axis. **Oncol Rep**, v. 37, n. 3, p. 1873-1882, Mar 2017. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098875> >.

DONGRE, A.; WEINBERG, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 20, n. 2, p. 69-84, Feb 2019. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459476> >.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, Mar 2005. ISSN 1386-6532 (Print)

1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753007> >.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev Med Virol**, v. 25 Suppl 1, p. 2-23, Mar 2015. ISSN 1099-1654 (Electronic)

1052-9276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25752814> >.

DOTTO, G. P.; RUSTGI, A. K. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. **Cancer Cell**, v. 29, n. 5, p. 622-637, May 9 2016. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165741>>.

EICHTEN, A. et al. Resistance to Anti-VEGF Therapy Mediated by Autocrine IL6/STAT3 Signaling and Overcome by IL6 Blockade. **Cancer Res**, v. 76, n. 8, p. 2327-39, Apr 15 2016. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921327>>.

EINSTEIN, M. H. et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 6, p. 347-56, Jun 2009. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467474>>.

ESQUIVEL-VELAZQUEZ, M. et al. The role of cytokines in breast cancer development and progression. **J Interferon Cytokine Res**, v. 35, n. 1, p. 1-16, Jan 2015. ISSN 1557-7465 (Electronic)

1079-9907 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25068787>>.

FAGHIHLOO, E. et al. Cdc6 expression is induced by HPV 16 E6 and E7 oncogenes and represses E-cadherin expression. **Cancer Gene Ther**, Nov 11 2016. ISSN 1476-5500 (Electronic)

0929-1903 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27834356>>.

FAUQUET, C. M.; STANLEY, J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. **Arch Virol**, v. 150, n. 10, p. 2151-79, Oct 2005. ISSN 0304-8608 (Print)

0304-8608 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16132185>>.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 6, p. 482-93, Jun 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20489699>>.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 1 2015. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>>.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017. ISSN 2156-6976 (Print)

2156-6976 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560055>>.

FRANCO, E. L. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**, v. 43, n. 6, p. 992-1000, Jun 15 1989. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2732011>>.

FUNG, N. et al. The role of human papillomavirus on the prognosis and treatment of oropharyngeal carcinoma. **Cancer Metastasis Rev**, v. 36, n. 3, p. 449-461, Sep 2017. ISSN 1573-7233 (Electronic) 0167-7659 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28812214>>.

GAMMON, L. et al. Sub-sets of cancer stem cells differ intrinsically in their patterns of oxygen metabolism. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62493, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638097>>.

GAO, J.; ZHAO, S.; HALSTENSEN, T. S. Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 35, n. 6, p. 3265-74, Jun 2016. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27108527>>.

GENE, N.-. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>>.

GIARRE, M. et al. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. **J Virol**, v. 75, n. 10, p. 4705-12, May 2001. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312342>>.

GRAVES, C. A. et al. The translational significance of epithelial-mesenchymal transition in head and neck cancer. **Clin Transl Med**, v. 3, n. 1, p. 60, Dec 2014. ISSN 2001-1326 (Print). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632320>>.

GUERRERA, I. C. et al. Regulation of interleukin-6 in head and neck squamous cell carcinoma is related to papillomavirus infection. **J Proteome Res**, v. 13, n. 2, p. 1002-11, Feb 7 2014. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24405156>>.

GUO, Y. et al. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 7, p. 904-10, Nov 2012. ISSN 1532-1967 (Electronic)

0305-7372 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22651903>>.

GYAMFI, J. et al. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8859, Jun 11 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29891854>>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>>.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>.

- HARVEY, K. F.; ZHANG, X.; THOMAS, D. M. The Hippo pathway and human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 4, p. 246-57, Apr 2013. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467301>>.
- HATAKEYAMA, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition in human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 32, n. 6, p. 2673-9, Dec 2014. ISSN 1791-2431 (Electronic)
1021-335X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241968>>.
- HAVEL, J. J.; CHOWELL, D.; CHAN, T. A. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, Feb 12 2019. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30755690>>.
- HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 8, Aug 1 2016. ISSN 1943-0264 (Electronic)
1943-0264 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27481709>>.
- HELLNER, K. et al. HPV 16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. **Virology**, v. 391, n. 1, p. 57-63, Aug 15 2009. ISSN 1096-0341 (Electronic)
0042-6822 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19552933>>.
- HERRERO, R. et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 23, p. 1772-83, Dec 3 2003. ISSN 1460-2105 (Electronic)
0027-8874 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652239>>.
- HO, T. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinomas: a case-control analysis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 132, n. 7, p. 756-61, Jul 2006. ISSN 0886-4470 (Print)
0886-4470 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847185>>.
- HU, J. et al. Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network. **Nat Biotechnol**, v. 31, n. 6, p. 522-9, Jun 2013. ISSN 1546-1696 (Electronic)
1087-0156 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604282>>.
- HUANG DW, S. B., LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature Protoc.**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.
- HUANG DW, S. B., LEMPICKI RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2009.
- HUANG, J. J.; BLOBE, G. C. Dichotomous roles of TGF-beta in human cancer. **Biochem Soc Trans**, v. 44, n. 5, p. 1441-1454, Oct 15 2016. ISSN 1470-8752 (Electronic)

0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911726> >.

IARC. **IARC - Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses.** 90: 1-636 p. 2007.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 6, p. 415-24, Jun 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495575> >.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 2017.

JENSEN, D. H. et al. Molecular profiling of tumour budding implicates TGFbeta-mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. **J Pathol**, v. 236, n. 4, p. 505-16, Aug 2015. ISSN 1096-9896 (Electronic)

0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25925492> >.

JEON, S.; ALLEN-HOFFMANN, B. L.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **J Virol**, v. 69, n. 5, p. 2989-97, May 1995. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707525> >.

JIANG, J.; TANG, Y. L.; LIANG, X. H. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. **Cancer Biol Ther**, v. 11, n. 8, p. 714-23, Apr 15 2011. ISSN 1555-8576 (Electronic)

1538-4047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389772> >.

JOLLY, M. K. et al. Towards elucidating the connection between epithelial-mesenchymal transitions and stemness. **J R Soc Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140962, Dec 6 2014. ISSN 1742-5662 (Electronic)

1742-5662 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339690> >.

JONES, S. A.; JENKINS, B. J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 12, p. 773-789, Dec 2018. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30254251> >.

JUNG, Y. S.; KATO, I.; KIM, H. R. A novel function of HPV 16-E6/E7 in epithelial-mesenchymal transition. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 435, n. 3, p. 339-44, Jun 7 2013. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628416> >.

KACZKOWSKI, B. et al. Integrative analyses reveal novel strategies in HPV11,-16 and -45 early infection. **Sci Rep**, v. 2, p. 515, 2012. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22808421> >.

- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, Jun 2009. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487818>>.
- KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333-339, Oct 17 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132290>>.
- KIM, P. et al. TissGDB: tissue-specific gene database in cancer. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D1031-D1038, Jan 4 2018. ISSN 1362-4962 (Electronic)
0305-1048 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29036590>>.
- KORESSAAR T, R. M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 **Bioinformatics** v. 23, n. 10, p. 1289-91, 2007.
- KUMARASWAMY, K. L.; VIDHYA, M. Human papilloma virus and oral infections: an update. **J Cancer Res Ther**, v. 7, n. 2, p. 120-7, Apr-Jun 2011. ISSN 1998-4138 (Electronic)
1998-4138 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21768696>>.
- LAM, S. et al. Wild-type p53 inhibits pro-invasive properties of TGF-beta3 in breast cancer, in part through regulation of EPHB2, a new TGF-beta target gene. **Breast Cancer Res Treat**, v. 148, n. 1, p. 7-18, Nov 2014. ISSN 1573-7217 (Electronic)
0167-6806 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257729>>.
- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 178-96, Mar 2014. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556840>>.
- LEE, S. et al. Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 410-20, Mar 2011. ISSN 1365-2567 (Electronic)
0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208204>>.
- LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, Jan 2011. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160525>>.
- LEEMANS, C. R.; SNIJDERS, P. J. F.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269-282, May 2018. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29497144>>.
- LEFEVRE, M. et al. Epithelial to mesenchymal transition and HPV infection in squamous cell oropharyngeal carcinomas: the papillophar study. **Br J Cancer**, v. 116, n. 3, p. 362-369, Jan 2017. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28072763> >.

LEHOUX, M. et al. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 3486-500, Apr 2012. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278251> >.

LI, H. et al. The integrated pathway of TGFbeta/Snail with TNFalpha/NFKappaB may facilitate the tumor-stroma interaction in the EMT process and colorectal cancer prognosis. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 4915, Jul 7 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28687755> >.

LICHTENSTEIN, E. et al. Using radon risk to motivate smoking reduction: evaluation of written materials and brief telephone counselling. **Tob Control**, v. 9, n. 3, p. 320-6, Sep 2000. ISSN 0964-4563 (Print)

0964-4563 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982577> >.

LIU, J. et al. PI3K/Akt/HIF-1alpha signaling pathway mediates HPV-16 oncoprotein-induced expression of EMT-related transcription factors in non-small cell lung cancer cells. **J Cancer**, v. 9, n. 19, p. 3456-3466, 2018. ISSN 1837-9664 (Print)

1837-9664 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30310502> >.

LOPEZ, R. V. et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. **Cancer Causes Control**, v. 25, n. 4, p. 461-71, Apr 2014. ISSN 1573-7225 (Electronic)

0957-5243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474236> >.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 24 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> >.

MELLIN, H. et al. Human papillomavirus and DNA ploidy in tonsillar cancer--correlation to prognosis. **Anticancer Res**, v. 23, n. 3C, p. 2821-8, May-Jun 2003. ISSN 0250-7005 (Print)

0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12926119> >.

MESH, N.-. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> >.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-60, Aug 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592731> >.

NAGASAKI, T. et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. **Br J Cancer**, v. 110, n. 2, p. 469-78, Jan 21 2014. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346288> >.

NEUZILLET, C. et al. Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 147, p. 22-31, Mar 2015. ISSN 1879-016X (Electronic)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444759> >.

ORTIZ-MONTERO, P.; LONDONO-VALLEJO, A.; VERNOT, J. P. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. **Cell Commun Signal**, v. 15, n. 1, p. 17, May 4 2017. ISSN 1478-811X (Electronic)

1478-811X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472950> >.

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 4, n. 4, p. 415-28, Jun 1995. ISSN 1055-9965 (Print)

1055-9965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655339> >.

PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 7, p. 497-512, Jul 2014. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981363> >.

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, n. 11, p. 418-25, Nov 1997. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426469> >.

POLZ-DACEWICZ, M. et al. Salivary and serum IL-10, TNF-alpha, TGF-beta, VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. **Infect Agent Cancer**, v. 11, p. 45, 2016. ISSN 1750-9378 (Print)

1750-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547238> >.

PUBMED, N.-. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed >.

PURAM, S. V. et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1611-1624 e24, Dec 14 2017. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29198524> >.

RAMACHANDRAN, A. et al. TGF-beta uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. **Elife**, v. 7, Jan 29 2018. ISSN 2050-084X (Electronic)

2050-084X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29376829> >.

RAUTAVA, J. et al. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. **J Clin Virol**, v. 53, n. 2, p. 116-20, Feb 2012. ISSN 1873-5967 (Electronic)

1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177275> >.

RODON, J. et al. Phase I dose-escalation and -expansion study of buparlisib (BKM120), an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. **Invest New Drugs**, v. 32, n. 4, p. 670-81, Aug 2014. ISSN 1573-0646 (Electronic)

0167-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652201> >.

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. ADP-ribosylation of actins in fibroblasts and myofibroblasts by botulinum C2 toxin: influence on microfilament morphology and migratory behavior. **Electrophoresis**, v. 17, n. 11, p. 1776-80, Nov 1996. ISSN 0173-0835 (Print)

0173-0835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982611> >.

SCHEFFNER, M. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495-505, Nov 5 1993. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221889> >.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16086, Dec 1 2016. ISSN 2056-676X (Electronic)

2056-676X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27905473> >.

SCHWARTZ, S. M. et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 21, p. 1626-36, Nov 4 1998. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811312> >.

SEN, B. et al. Sustained Src inhibition results in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and cancer cell survival via altered Janus-activated kinase-STAT3 binding. **Cancer Res**, v. 69, n. 5, p. 1958-65, Mar 1 2009. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223541> >.

SERUGA, B. et al. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 11, p. 887-99, Nov 2008. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846100> >.

SHEN, Z. et al. MicroRNA-105 is involved in TNF-alpha-related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 12, p. 3213, Dec 13 2017. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29238068> >.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 14, n. 10, p. 611-629, Oct 2017. ISSN 1759-4782 (Electronic)

1759-4774 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28397828> >.

STABILE, L. P. et al. IL6 is associated with response to dasatinib and cetuximab: Phase II clinical trial with mechanistic correlates in cetuximab-resistant head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 69, p. 38-45, Jun 2017. ISSN 1879-0593 (Electronic)

1368-8375 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28559019> >.

STANAM, A. et al. Upregulated interleukin-6 expression contributes to erlotinib resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Mol Oncol**, v. 9, n. 7, p. 1371-83, Aug 2015. ISSN 1878-0261 (Electronic)

1574-7891 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888065> >.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nat Med**, v. 12, n. 8, p. 895-904, Aug 2006. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892035> >.

STRING. Disponível em: < <https://string-db.org/> >.

SYRJANEN, K. et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **Int J Oral Surg**, v. 12, n. 6, p. 418-24, Dec 1983. ISSN 0300-9785 (Print)

0300-9785 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6325356> >.

SYRJANEN, S.; PURANEN, M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 2, p. 259-74, 2000. ISSN 1045-4411 (Print)

1045-4411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12002819> >.

SZABO, G.; SAHA, B. Alcohol's Effect on Host Defense. **Alcohol Res**, v. 37, n. 2, p. 159-70, 2015. ISSN 2168-3492 (Print)

2168-3492 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26695755> >.

TAHER, M. Y.; DAVIES, D. M.; MAHER, J. The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer. **Biochem Soc Trans**, v. 46, n. 6, p. 1449-1462, Dec 17 2018. ISSN 1470-8752 (Electronic)

0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30467123> >.

TANAKA, T. I.; ALAWI, F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. **Dent Clin North Am**, v. 62, n. 1, p. 111-120, Jan 2018. ISSN 1558-0512 (Electronic)

0011-8532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126488> >.

TAUBE, J. H. et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 35, p. 15449-54, Aug 31 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713713> >.

TECHNOLOGY, C. S. Jak/Stat: IL6 Receptor Signaling. **Cancer's energy source: metabolic reprogramming**, 2018a. Disponível em: < <https://learn.cellsignal.com/hubfs/landing-pages/2018/18-Signaling-Pathways/18-IMM-41697-JakStat-PWHO-Revision.pdf?hsCtaTracking=4a2a952b-71de-4ec6-8c06-b87447b13eba%7C7529a645-c12c-43d0-924b-eedde733e67e> >.

_____. **TGF-β/Smad Signaling**. **Cancer's energy source: metabolic reprogramming** 2018b.

TUNA, M.; AMOS, C. I. Next generation sequencing and its applications in HPV-associated cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8877-8889, Jan 31 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27784002>>.

UNTERGASSER A, C. I., KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research** v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VARILLA, V.; ATIENZA, J.; DASANU, C. A. Immune alterations and immunotherapy prospects in head and neck cancer. **Expert Opin Biol Ther**, v. 13, n. 9, p. 1241-56, Sep 2013. ISSN 1744-7682 (Electronic)

1471-2598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789839>>.

VASILAKI, E. et al. Ras and TGF-beta signaling enhance cancer progression by promoting the DeltaNp63 transcriptional program. **Sci Signal**, v. 9, n. 442, p. ra84, Aug 23 2016. ISSN 1937-9145 (Electronic)

1945-0877 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555661>>.

VOKES, E. E.; AGRAWAL, N.; SEIWERT, T. Y. HPV-Associated Head and Neck Cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 107, n. 12, p. djv344, Dec 2015. ISSN 1460-2105 (Electronic)

0027-8874 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26656751>>.

WAKISAKA, N. et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. **Histopathology**, v. 66, n. 6, p. 771-80, May 2015. ISSN 1365-2559 (Electronic)

0309-0167 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25039283>>.

WEBER, F. et al. Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. **JAMA**, v. 297, n. 2, p. 187-95, Jan 10 2007. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213402>>.

WOODBY, B.; SCOTT, M.; BODILY, J. The Interaction Between Human Papillomaviruses and the Stromal Microenvironment. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 144, p. 169-238, 2016. ISSN 1878-0814 (Electronic)

1877-1173 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27865458>>.

WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer**, v. 102, n. 4, p. 639-44, Feb 16 2010. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087353>>.

XU, J.; LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Res**, v. 19, n. 2, p. 156-72, Feb 2009. ISSN 1748-7838 (Electronic)

1001-0602 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153598>>.

YADAV, A. et al. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 1658-67, Dec 2011. ISSN 1557-3125 (Electronic)

1541-7786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976712> >.

YU, L. et al. Tumor necrosis factor alpha induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF-kappaB signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer. **Oncol Rep**, v. 31, n. 1, p. 321-7, Jan 2014. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220622> >.

YUN, M. R. et al. ERK-dependent IL-6 autocrine signaling mediates adaptive resistance to pan-PI3K inhibitor BKM120 in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 37, n. 3, p. 377-388, Jan 18 2018. ISSN 1476-5594 (Electronic)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28945228> >.

ZHANG, W. et al. Overexpression of Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition via STAT3 Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Oncol Res**, v. 25, n. 5, p. 843-852, May 24 2017. ISSN 1555-3906 (Electronic)

0965-0407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28508744> >.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, May 2002. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010> >.

ANEXO – artigos publicados

Review Article

Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Normal and Pathologic Processes

Ana Carolina B. Stefanini,^{1,2} Bianca Rodrigues da Cunha,^{1,2}
Tiago Henrique,¹ and Eloiza H. Tajara^{1,2}

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine of São José do Rio Preto, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

²Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Eloiza H. Tajara; tajara@famerp.br

Received 7 July 2015; Revised 16 October 2015; Accepted 29 October 2015

Academic Editor: Sunil Hwang

Copyright © 2015 Ana Carolina B. Stefanini et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Human kallikrein-related peptidases (KLKs) are a subgroup of serine proteases that participate in proteolytic pathways and control protein levels in normal physiology as well as in several pathological conditions. Their complex network of stimulatory and inhibitory interactions may induce inflammatory and immune responses and contribute to the neoplastic phenotype through the regulation of several cellular processes, such as proliferation, survival, migration, and invasion. This family of proteases, which includes one of the most useful cancer biomarkers, kallikrein-related peptidase 3 or PSA, also has a protective effect against cancer promoting apoptosis or counteracting angiogenesis and cell proliferation. Therefore, they represent attractive therapeutic targets and may have important applications in clinical oncology. Despite being intensively studied, many gaps in our knowledge on several molecular aspects of KLK functions still exist. This review aims to summarize recent data on their involvement in different processes related to health and disease, in particular those directly or indirectly linked to the neoplastic process.

1. Introduction

Human kallikrein-related peptidases (KLKs) are a subgroup of serine proteases that have important roles in regulating normal physiological functions, such as immune response, skin desquamation, enamel formation, and semen liquefaction, and the corresponding pathological conditions. There is growing evidence in the literature supporting the view that KLKs are also implicated in tumorigenesis by activating proteolytic processes associated with the neoplastic phenotype. The potential mechanisms involved include the modulation of growth factor bioavailability and activation of hormone and protease-activated receptors (PARs) resulting in proliferative signaling pathways, the degradation of extracellular matrix, cleavage of junction proteins and induction of an epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype leading to increased tumor cell migration and invasion, and the modulation of interactions between cancer cells and their

microenvironment promoting angiogenesis and other protumorigenic processes (reviewed by [1–3]).

The potential of KLKs as cancer markers has been suggested for several members of this protease family [2, 4–6], particularly for kallikrein-related peptidase 3 or prostate-specific antigen (PSA) [7]. PSA is well accepted for assessing recurrence risk in patients with prostate cancer, but its predictive power for diagnosis has been questioned, since several factors other than malignancy may be associated with its high levels in serum, such as preanalytical variables, benign diseases, and drugs [8, 9]. Biomarker panels combining PSA and other promising markers, including members of the KLK family, are expected to improve prostate cancer screening and reduce unnecessary treatments, a strategy that may also be used for detection and monitoring of other malignancies and nonmalignant diseases.

In this paper, we review the current knowledge about the evolution and functions of human kallikrein-related

peptidases, their substrates, and their role in health and disease, particularly in the context of cancer.

2. The Human Degradome

Protein synthesis is essential for living, metabolically active cells, but its counterpart, protein degradation, is no less important. Proteolytic mechanisms driven by proteases maintain appropriate protein levels and recognize and degrade the misfolded or mislocalized ones. In addition to acting in nonspecific catabolism, proteases are involved in selective cleavages and activations, modulating protein-protein interactions and contributing to cell signaling both as catalytic units and as multicatalytic complexes. Due to their broad-spectrum actions, proteases play critical roles in regulating normal biological processes, including DNA replication and transcription, cell proliferation, differentiation, and apoptosis. When altered, they may facilitate the development of pathological conditions such as inflammatory and degenerative disorders (reviewed by [10]). The importance of these hydrolytic enzymes is reflected by the number of genes already identified in several mammalian species, with more than 500 in human and primates and even more in rodents [11–14].

The complete set of human proteases—named the human degradome—is distributed in aspartic-, threonine-, cysteine-, serine-, and metalloprotease classes according to the chemical group involved in their catalytic activity [15, 16], and the latter three are the most populated classes [10]. Their substrate cleavage patterns may be specific for a single peptide, as in the case of proteases involved in signaling pathways, or common for a broad range of peptides, which is well exemplified by digestive enzymes [17]. Otherwise, inactive proteases or pseudoproteases bind to their cognate substrate without cleaving them, thus exerting a regulatory function [18].

Detailed information on proteases in prokaryotes and eukaryotes, protease families, pseudogenes, the sequences derived from endogenous retroviruses, 3D structures, substrates, and proteolytic events has been accumulated in different databases such as MEROPS [19] and Degradome [20].

3. The Serine Protease Group

Approximately one-third of proteolytic enzymes are serine proteases, usually endopeptidases. These enzymes use the serine residue present in their active site as a nucleophile to attack the peptide bond of the substrate [21]. In humans, many serine proteases are involved in extra- and intracellular processes mainly related to food digestion, blood coagulation, and immunity (reviewed by [1, 22]). Although these processes are essential for the purposes of catabolism or selective cleavages required for cell signaling, serine protease activity (as well as that of other proteases) is potentially devastating, and several cellular mechanisms were selected to modulate and keep them within limits. For example, they are stored as inactive zymogens or inside granules and can access the substrates only through controlled actions. In addition, serpins, a superfamily of serine protease inhibitors, antagonize their

activities in many metabolic pathways, arresting the proteases into an irreversible complex (reviewed by [1]).

Although tightly controlled, several serine proteases have been associated with human diseases. For example, high granzyme levels (granule-secreted enzymes found in cytotoxic T cells and natural killer cells) have been observed in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [23], asthma [24], diabetes [25], atherosclerosis [26], and chronic obstructive pulmonary [27] and cardiovascular diseases [28]. They have also been implicated in susceptibility to skin tearing and disorganized collagen as observed in chronic wounds and aged/sun-damaged skin (reviewed by [29]). The role of granzymes in these conditions resides in their ability to cleave many substrates, inducing apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways [30]. Their potential to create or destroy autoimmune epitopes [31] and be improperly regulated in chronic wounds or released non-specifically from immune cell into extracellular spaces also contributes to chronic inflammation or extracellular matrix disorganization [27, 32].

Increased levels of neutrophil proteases such as elastase, cathepsin G, and myeloblastin have also been correlated with the severity of cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease [33]. Similarly, tryptase and chymase, two serine proteases stored in mast cell granules, take part in the pathophysiology of asthma [34], psoriasis [35], atherothrombosis [36], and fibrotic [37] and inflammatory kidney diseases [38].

With respect to cancer, several serine proteases have been linked to tumor development and progression by activating proteolytic processes that are associated with the neoplastic phenotype (reviewed by [1]). Specifically, a family of serine proteases expressed and secreted in many tissues participates in complex networks of cell signaling pathways that are related to cancer [4–7]. One of the most useful cancer biomarkers in clinical medicine is kallikrein-related peptidase 3 or PSA, which is a member of this family (reviewed by [7]), and there is evidence that other KLKs are also deregulated in cancer and other diseases [4, 39–147] as summarized in Table 1.

4. The Human Kallikreins

Human kallikreins, initially detected at high levels in pancreas, *kallikreas* in Greek, include plasma and tissue serine proteases, which are two categories that differ in molecular weight, substrate specificity, and gene structure. The unique plasma kallikrein (PKK) is a glycoprotein encoded by the *KLKB1* gene on chromosome region 4q35 and is predominantly synthesized in the liver as an inactive precursor. After activation by the coagulation factor XII, PKK cleaves high molecular weight kininogen to release bradykinin, a mediator of blood coagulation, inflammation, blood pressure, and thrombosis risk [148].

4.1. Kallikrein-Related Peptidases at DNA Level: Genomic Organization and Evolutionary Aspects. The 15 tissue kallikreins or kallikrein-related peptidases (KLKs) are encoded by genes that are tightly clustered in an approximately

TABLE 1: Kallikrein-related peptidases. Gene expression pattern, SNPs, and promoter methylation related to cancer and other diseases. CSF = cerebrospinal fluid.

Disease	Kallikrein	Factor	Observation	Reference
Alzheimer's disease	<i>KLKs 6 (CSF), 10</i>	Increased expression		
	<i>KLKs 6 (brain, blood), 7</i>	Decreased expression		[39–42]
Amelogenesis imperfecta	<i>KLK4</i>	Mutation	Disease-causing mutation	[43–45]
	<i>KLK6</i>	Decreased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	
	<i>KLK8</i>	SNP	Suggestion of unfavorable prognosis	[46, 47]
Asthma	<i>KLK3</i>	SNP		[48]
Atopic dermatitis	<i>KLK5</i>	Decreased expression		[49, 50]
Bipolar disease	<i>KLK8</i>	SNP	Suggestion of unfavorable prognosis	[51]
Coronary artery disease	<i>KLK1</i>	SNP	Controversial prognosis	
	<i>KLK1</i>	Increased expression	Predictor of disease	[52, 53]
Kidney disease				
Lupus nephritis	<i>KLK1</i>	SNP	Disease-associated SNP	
Acute kidney injury	<i>KLK1</i>	SNP	Suggestion of unfavorable prognosis	[54–56]
Diabetic nephropathy	<i>KLK1</i>	Increased expression	Tubular inflammation	
Multiple sclerosis	<i>KLK6</i>	Increased expression	Advanced disease	[57–59]
Dementia with Lewy bodies	<i>KLK6</i>	Decreased expression	Suggestion of diagnostic marker	[60]
Other neurodegenerative diseases	<i>KLKs 1, 5, 6, 7, and 9</i>	Increased expression	Suggestion of disease-associated marker	[61–63]
	<i>KLKs 5–8, 10–13, and 15</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	[64–73]
	<i>KLK5</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	
Psoriasis	<i>KLK8</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	[74, 75]
	<i>KLKs 6, 8, 10, and 13</i>	Increased expression	Severity of skin lesions	
Parkinson's disease	<i>KLK6</i>	Increased expression	Disease-associated marker	[76]
Sjogren disease	<i>KLK11</i>	Increased expression	Suggestion of disease-associated marker	[77]
Breast cancer	<i>KLKs 2, 4</i>	SNP	Breast cancer risk	
	<i>KLK3</i>	SNP	Association with less aggressiveness	
	<i>KLKs 5, 10, and 14</i>	Increased expression	Potential diagnostic biomarkers	
	<i>KLKs 6, 12 variant 3, and 15</i>	Increased expression	Suggestion of favorable prognosis	[4, 47, 78–83]
	<i>KLKs 3, 8, and 12</i>	Decreased expression	Suggestion of favorable prognosis	
	<i>KLKs 5, 7</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	
Cervix cancer	<i>KLK10</i>	Methylation	Suggestion of favorable prognosis	
	<i>KLK7</i>	Increased expression	Controversial prognosis	[84, 85]
Colorectal cancer	<i>KLKs 4, 6, 7, and 10</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	[86–90]

TABLE 1: Continued.

Disease	Kallikrein	Factor	Observation	Reference	
Gastric cancer	<i>KLKs 6, 7, and 10</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis	[90–95]	
	<i>KLK13</i>	Increased expression	Suggestion of favorable prognosis		
	<i>KLK11</i>	Decreased expression	Suggestion of unfavorable prognosis		
Head and neck cancer	<i>KLK10</i>	Methylation	Suggestion of unfavorable prognosis	[96–99]	
	<i>KLKs 4–8, 10</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis		
Intracranial tumor	<i>KLKs 6–8</i>	Increased expression	Controversial prognosis	[100, 101]	
Lung cancer	<i>KLK10</i>	Methylation	Suggestion of unfavorable prognosis	[102–106]	
	<i>KLKs 5–7</i>	Increased expression			
	<i>KLKs 11, 13, and 14</i>	Increased expression	Diagnostic marker		
	<i>KLKs 8, 12</i>	Decreased expression	Suggestion of unfavorable prognosis		
Melanoma	<i>KLKs 6, 8, and 13</i>	Increased expression	Suggestion of favorable prognosis	[107, 108]	
	<i>KLK7</i>	Increased expression			
Ovarian cancer	<i>KLKs 4, 6</i>	Increased expression	Advanced stage	[47, 78, 109–125]	
	<i>KLKs 8–10, 11, 13, and 14</i>	Increased expression	Suggestion of favorable prognosis		
	<i>KLKs 5, 7</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis		
	<i>KLK10, KLKP1</i>	SNP	Suggestion of unfavorable prognosis		
Pancreatic cancer	<i>KLKs 3, 15</i>	SNP	[126]		
	<i>KLK7</i>	Increased expression		Controversial prognosis	
Prostate cancer	<i>KLK3</i>	Increased expression	Disease monitoring and recurrent prediction	[47, 78, 127–147]	
	<i>KLKs 1, 2, 4, and 15</i>	Increased expression	Controversial prognosis		
	<i>KLKP1</i>	Decreased expression			
	<i>KLK7</i>	Increased expression	Suggestion of unfavorable prognosis		
	<i>KLK11</i>	Decreased expression	Suggestion of unfavorable prognosis		
	<i>KLKs 2, 3, 4, and 10</i>	SNP			
	<i>KLK12</i>	SNP	Cancer predisposition		
	<i>KLKs 4, 14, and 15</i>	SNP	Suggestion of unfavorable prognosis		

300 kb sequence of the 19q13.33–13.41 chromosome region, all containing 5 coding exons with comparable lengths and sequence homology [149, 150]. A pseudogene (*KLKP1*) has also been assigned to this region [151], as well as multiple repetitive elements such as ALU, Tigger2, MER8, and MSRI [152]. The large contiguous human *KLK* gene cluster is limited by the *ACPT* (testicular acid phosphatase) gene and the Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) family of genes at centromeric and telomeric positions, respectively,

and other less characterized genes (*SNORD88C*, *C19orf48*, *MGC45922*, and *CTUI*) (Figure 1).

The colocation and sequence conservation in a wide variety of species make this human tissue serine proteinase family a very interesting target for evolutionary studies [153]. The phylogenetic analysis of *KLKs* performed by the Maximum Likelihood method [154], using the transcript isoforms of 15 *KLK* genes, the pseudogene-1 (*KLKP1*) sequence, and the *PRSS1* (trypsin 1) transcript sequence as an external group,

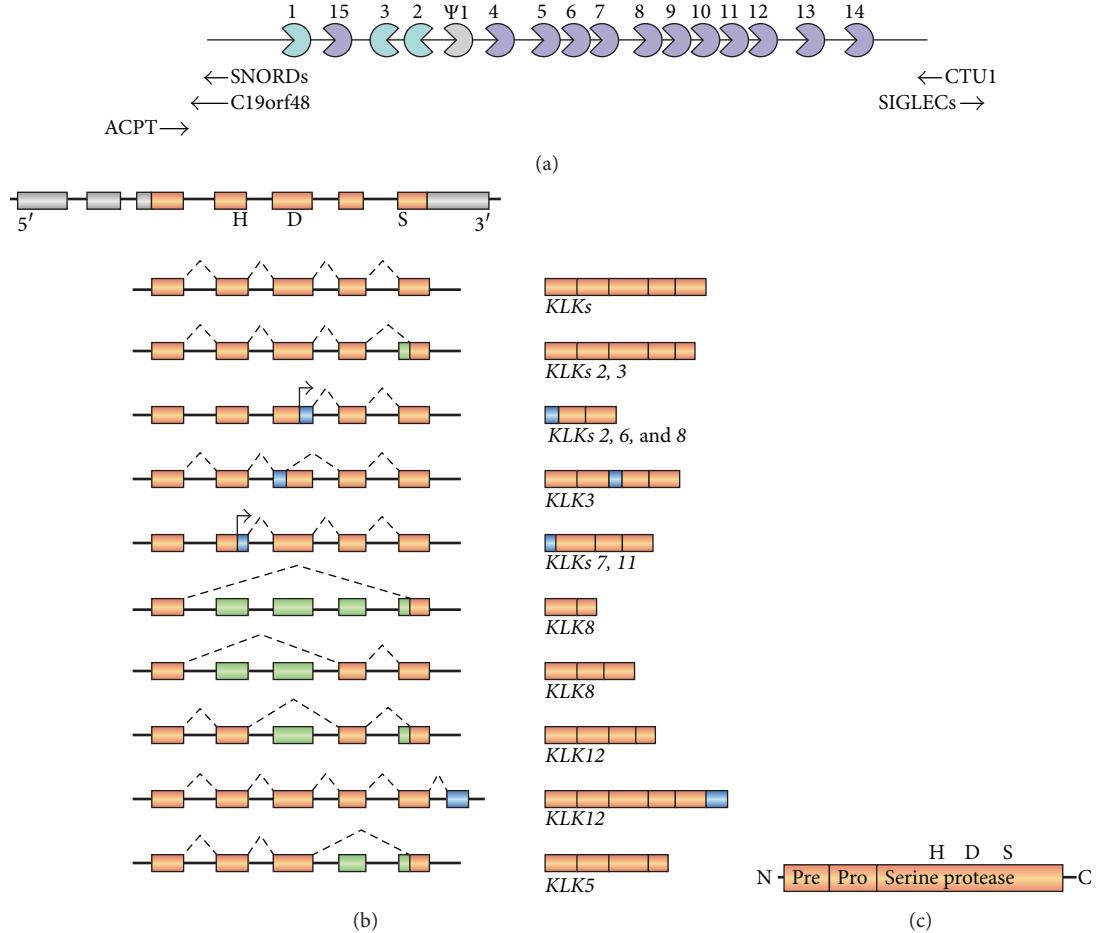


FIGURE 1: KLK gene cluster and schematic representation of the human *KLK* gene and protein structure. (a) *KLK* gene cluster on the 19q13.33–13.41 chromosome region including the pseudogene *KLK1* and the transcriptional direction from centromere to telomere, except for *KLK2* and *KLK3*, which have the opposite transcriptional direction. The classic *KLK* genes (*KLKs 1–3*) are turquoise, *KLK4–KLK15* are medium purple, and the Ψ *KLK1* processed pseudogene is silver; the arrowheads represent the neighboring genes: *ACPT* (testicular acid phosphatase) and the *Siglec* (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) gene family as well as other less characterized genes (*SNORDs*, *C19orf48*, and *CTU1*). (b) The human *KLK* gene consists of 5 coding exons (orange boxes represent coding exons; silver boxes represent noncoding exons) and their 4 intervening introns. The positions of the catalytic residues are highly conserved with the histidine (H), aspartic acid (D) 3, and serine (S) codons on coding exons 2, 3, and 5, respectively. Most *KLK* genes demonstrate alternative splicing, which generates several transcript variants. Alternative 3' splice sites or skipped exons (shown in green) result in short variants of *KLKs 2, 3, 5, 8*, and *12 genes*. Alternative 5' splice sites or start sites (shown in blue) also generate short variants of *KLKs 2, 3, 6, 7, 8*, and *11 genes*. Utilization of the alternative exon 6 generates a long transcript encoding a variant of *KLK12* gene (shown in blue). (c) *KLK* proteins are single-chain proteases that are synthesized as preproenzymes and are proteolytically processed to pro-*KLKs* and secreted after removal of the terminal signal peptide (Pre). The *KLK* sequence also includes a propeptide (Pro) that maintains the inactive state of the enzyme, as well as a serine protease domain.

reveals five major branches: (a) the classic *KLKs* (*KLKs 1–3*), (b) *KLKs 4, 5, 7*, and *14* and *KLK1*, (c) *KLKs 9* and *11*, (d) *KLKs 8, 10*, and *15*, and (e) *KLKs 12* and *13*, and a separate branch with *KLK6*. The tree (Figure 2) is similar in several aspects to other phylogenetic analyses of this cluster [150, 153, 155–157] but also includes the isoforms and reinforces the idea that all *KLK* genes evolved from a single gene by successive tandem duplications and genomic rearrangements facilitated by repetitive elements.

The high similarity between *KLK2* and *KLK3* sequences and the highest support value also suggest that they might have formed by duplication later in evolution. The data grouping *KLK4/KLK5* and *KLK9/KLK11* also corroborate

previous studies [153, 156]. The isolated position of *KLK6* in this phylogenetic tree, unlike the findings of other authors, may explain the apparent distance of the remaining family members in respect to normal and pathological functions.

4.2. Kallikrein-Related Peptidases at RNA Level: Transcriptional Regulation Mechanisms. Kallikrein-related peptidase expression is regulated at transcriptional, translational, and posttranslational levels. At the transcriptional level, several response elements (REs) have been identified in the *KLK* promoters such as an estrogen-related receptor γ (ERR γ) response element [158], a GATA binding motif in *KLK1* [159], and functional retinoic acid response elements (RAREs) in

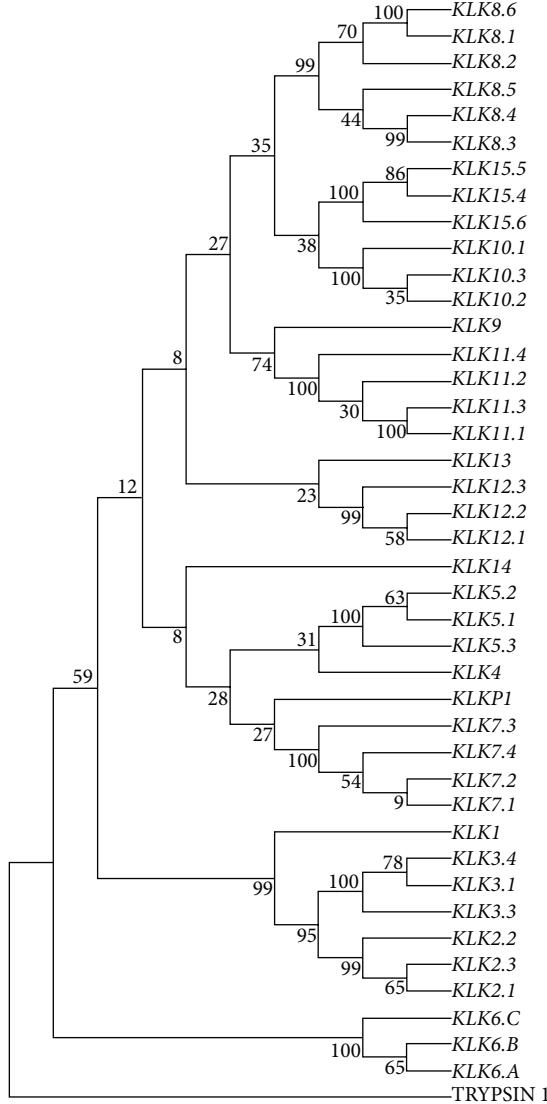


FIGURE 2: Phylogenetic relationships within the human tissue *KLK* gene family in humans. Phylogenetic analysis was performed using the MEGA5 [205] and Maximum Likelihood methods based on the GTR model (*General Time Reversible*) [154] with Gamma distribution. The bootstrap method was used (with 1000 data set replicates) to investigate node robustness [206]. The phylogenetic tree includes 15 *KLK* transcripts, the pseudogene-1 (*KLKP1*) sequence, and the trypsin 1 gene sequence (*PRSS1*) [155, 156]. The sequences were obtained from the NCBI Reference Sequence (RefSeq) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Numbers indicate the percentage of 1000 bootstrap replicates at each node in the consensus. Bootstrap value ≤ 95 .

KLK10 [160]. Due to the importance of *KLK3* expression in prostate cancer, a number of REs have already been described for its promoter, including Sp1/Sp3 [161] and WT1 transcription factor-binding sites [162], a putative p53 RE [163], an XBE (X-factor-binding element that binds specifically to the NF-kappaB p65 subunit) in the AREc (androgen response element enhancer core) [164], and androgen-responsive elements (AREs), the last of which were also present in the *KLK2* promoter (reviewed by [127, 165]).

KLK gene expression can also be regulated by epigenetic mechanisms, including histone modifications such as DNA methylation as well as microRNAs (reviewed by [166]), which can affect normal cell physiology and facilitate tumorigenesis if altered. In fact, aberrant promoter methylation leading to

KLK10 downregulation has been described in acute lymphoblastic leukemia [167] as well as in breast [168], gastric [91], and prostate cancer [169]. Similarly, abnormal histone acetylation at *KLK2* and *KLK3* sequences and deregulated expression of miRNAs targeting *KLK* genes have also been reported in kidney, prostate, and breast cancer cell lines (reviewed by [166]).

In addition to epigenetic events, polymorphisms in regulatory sequences can potentially alter RNA transcription rates and protein levels, as was observed for the homozygous G base substitution (rs266882) in the androgen response element (ARE-1) of the *KLK3* promoter [170] and for polymorphic alleles in the 5'-flanking region of the *KLK1* gene [171]. *KLK* gene activity is likewise affected by polymorphisms in

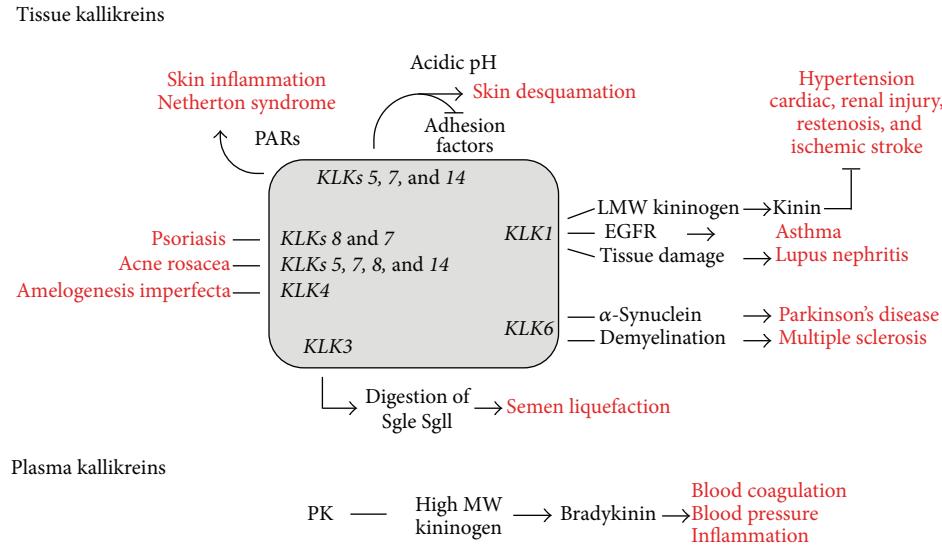


FIGURE 3: Schematic representation of KLK functions related to physiological and pathological conditions. KLKs are involved in several normal processes including blood pressure, coagulation, semen liquefaction, and skin desquamation and can also protect against cardiac injury and ischemia. These proteases may also participate in skin inflammation, neurodegeneration, and autoimmune diseases.

the coding region or in the 3'-UTR and downstream sequences of the *KLK1*, *KLK2*, *KLK3*, and *KLK7* genes (reviewed by [47]).

According to the NCBI Reference Sequence Database (accessed in November 20, 2014), with the exceptions of *KLK1*, *KLK4*, *KLK9*, *KLK13*, and *KLK14*, human *KLK* genes have multiple isoforms. The alternative transcripts apparently are species specific [155], and a number of them are cancer specific (reviewed by [172]), which supports the idea that they are constantly evolving. The diversity of these isoforms, especially those with no peptidase catalytic motifs, may indicate a type of activity control, for example, by competing for the same substrates or performing different tissue-specific functions [155].

4.3. Kallikrein-Related Peptidases at Protein Level. The KLKs are proteins of 230 amino acids and 28 to 33 kDa, although some small isoforms reach only 3 kDa. Their standard tertiary structure consists of two juxtaposed six-stranded antiparallel β -barrels and two α -helices with the active site between the barrels [173, 174]. They are synthesized as preproenzymes, which are proteolytically processed to pro-KLKs and secreted after removal of the terminal signal peptide. Their ability to release kinins was initially viewed as the definition of a true kallikrein. However, besides plasma kallikrein, only *KLK1* has the ability to cleave kininogen (in this case, low molecular weight kininogen) to release kinin. The tissue kallikrein-kinin system can protect against cardiac injury and ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis as well as against oxidative stress-induced renal cell apoptosis via stimulation of kinin B2 receptor-Akt [175]. Otherwise, this system appears to be involved in the development of lupus nephritis by increasing local tissue damage triggered by autoimmune inflammation [176] (Figure 3).

As mentioned above, *KLK* promoters have several hormone response elements, and their expression can be regulated by steroid hormones [177]. Therefore, KLK levels in different tissues are dependent not only on the presence of specific transcriptional and translational regulators, but also on proteolytic mechanisms, as previously referred to in the degradome section. Shaw and Diamandis [178] detected distinct expression profiles for several kallikrein-related peptidases: *KLK1* was highly expressed in the pancreas and salivary gland, *KLK2*, *3* (also observed in seminal plasma), and *11* were highly expressed in the prostate, *KLK5* was expressed in the skin, *KLK6* was expressed in the brain, *KLK9* was expressed in the heart, and *KLK12* was expressed in several anatomical sites. *KLKs 4, 8, 14*, and *15* exhibited a more homogeneous profile or were not detected in various tissues. Komatsu et al. [179] analyzed the skin stratum corneum and identified the presence of many KLKs (*KLKs 5–8, 10, 11, 13*, and *14*). Generally, expression patterns are compatible with their origins—duplicate genes have similar expression patterns in the same tissues, and coexpression patterns are compatible with their physiological functions [153].

5. Kallikrein-Related Peptidases and Their Relationship to Health and Disease

5.1. Normal Physiological Processes and Nonmalignant Diseases. Similar to what has been observed for other proteases, several regulatory mechanisms protect tissues from harmful proteolysis by KLKs. In addition to controlled proenzyme activation and endogenous inhibitors (such as α_2 -macroglobulin and serpins), there are also inactivating cleavages and allosteric regulation (reviewed by [165]). Regulatory steps may be performed by other proteases including members of the KLK family, which are supported by their

coexpression in the same tissue. For example, a KLK cascade including KLK2, KLK14, and probably other KLKs activates pro-KLK3 to generate the mature proteinase that directly cleaves the semenogelins SgI and SgII resulting in seminal clot liquefaction and spermatozoa release [180]. Recently, Yoon et al. [181] observed that MMP-20, which is usually expressed only in dental enamel, processes the prosequence of nine different *KLKs* and may be a nonspecific activator of the *KLK* family in pathological conditions.

Another proteolytic cascade has been described for the skin desquamation process in which KLK5 may be autoactivated or activated by KLK14 at neutral pH and then process KLK7, regulating skin desquamation. This cascade may start by KLK6 autoactivation following the cleavage of KLK11, which in turn activates KLK14. Although not completely understood, skin desquamation also depends on other proteases, including cathepsins, aspartic proteases, urokinase, plasmin, and the inflammatory metalloproteinases. Because KLK regulation is critical for proper desquamation, various endogenous inhibitors participate as attenuators of their activities, mainly LEKTI (serine protease inhibitor Kazal-type 5), a protein encoded by the *SPINK5* gene. Other factors such as an acidic environment and UV irradiation (and resulting inflammation) may inhibit LEKTI, also contributing to increased KLK expression and enhanced desquamation [64]. The lack of LEKTI expression in Netherton syndrome, a rare genetic skin disease characterized by congenital ichthyosis and severe allergic manifestations, indeed results in increased proteolytic activities of KLK5 and KLK7, which trigger an inflammatory process by activating protease-activated receptor-2 (PAR-2) and stimulating cytokine production [70] (Figure 3).

KLK deregulation is also observed in several other pathological conditions, of which neurodegenerative disorders are good examples (Figure 3). Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are the most prevalent human neurodegenerative disorders. Both are caused by the aggregation of proteins: AD is characterized by extracellular deposits of amyloid β ($A\beta$) and intraneuronal aggregates of tau protein in specific brain regions, and PD is characterized by intracellular neuronal deposits (Lewy bodies and neurites) formed by insoluble α -synuclein [182, 183].

There is convincing evidence from the literature on Alzheimer's disease that KLK6, the most abundant kallikrein-related peptidase in the central nervous system, cleaves the amyloid precursor protein (APP), a transmembrane glycoprotein from which $A\beta$ derives. The proteolytic activity of KLK6 against APP and substrates in the extracellular matrix and perineuronal net places this peptidase as a potential component of AD pathogenesis. KLK6 expression is reduced in brain tissues, as well as in cerebrospinal fluid of AD patients [42, 184, 185], but the mechanisms behind these findings and their functional consequences are not yet known. Actually, other enzymes (α -, β -, and γ -secretases) cleave APP in different sites and generate several fragments; some of them are aggregation-prone [183]. KLKs may, for example, promote a bias toward synthesis of these toxic fragments by β - and γ -secretases.

Besides KLK6, the kallikrein-related peptidases 7 and 10 show decreased and increased levels, respectively, in cerebrospinal fluid of AD patients [39]. Recently, Shropshire and collaborators observed that KLK7 is able to cleave the core of $A\beta$ in vitro, inhibiting $A\beta$ aggregation and reducing neuronal toxicity [186]. This result may open new opportunities towards treatments for AD.

Several studies on Parkinson's disease have implicated KLK6 in the degradation of intracellular α -synuclein [187]. Recent data suggested that secreted α -synuclein is also involved in the development of PD by affecting neuronal cell viability [188] and activating inflammatory response [189]. Although still controversial with respect to the intracellular type, KLK6 inefficiency in α -synuclein degradation seems to contribute to PD pathogenesis, probably due to an altered trafficking of KLK6 [187, 190] or to the resistance of certain forms of α -synuclein to KLK6-proteolysis [76, 191].

Multiple sclerosis (MS) is another example of neurodegenerative disorder in which KLK6 levels are altered. In MS patients, KLK6 is abundantly expressed and cleaves myelin proteins, resulting in demyelination and oligodendroglialopathy [192].

As may be noted from AD, PD, and MS data, KLK6 seems to be important for the neuronal homeostasis and survival. However, other kallikrein-related peptidases are probably involved in these processes, as can be deduced from the data on overexpression of KLK1 in epilepsy [193] and on the ability of a set of KLKs (KLK1, KLKs 5–7, and KLK9) to promote neural injury [62].

5.2. Malignant Diseases. As evidenced by the literature, particularly in prostate cancer, KLKs participate in proteolytic pathways that contribute to the neoplastic process (Figure 4). With respect to tumor growth, KLK1 facilitates EGFR and ERK1/2 cascade activation, which is involved in cell proliferation [194]. Similarly, KLK1, KLK2, and KLK3 can regulate tumor growth through IGF-binding protein (IGFBP) degradation, thereby allowing the release of the insulin-like growth factors (IGFs) and proliferative signals. However, a negative regulatory role for KLK3 in cancer has also been suggested because this protease can activate latent transforming growth factor- β (TGF β), a known suppressor of growth and promoter of apoptosis [2].

Recent data have demonstrated that kallikrein-related peptidase 4 and its substrate, promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF), modulate androgen receptor (AR) and mTOR signaling in prostate cells to regulate cell survival. In fact, KLK4 negatively regulates PLZF, thus preventing its binding and inhibition by AR, which keeps mTORC1 signaling active and ensures cell survival [195].

During neoplastic progression, different KLKs can regulate new vessel formation, which are essential to provide oxygen and nutrients to proliferating cancerous cells. KLKs 1 and 4 stimulate angiogenesis by cleaving kininogen to kinin or activating prometalloproteinases 2 and 9 to their active forms, thereby potentiating extracellular matrix hydrolysis and enabling endothelial cell migration and neovascularization [196–198]. Other kallikrein-related peptidases (KLKs 2 and 4) can stimulate the urokinase plasminogen activator

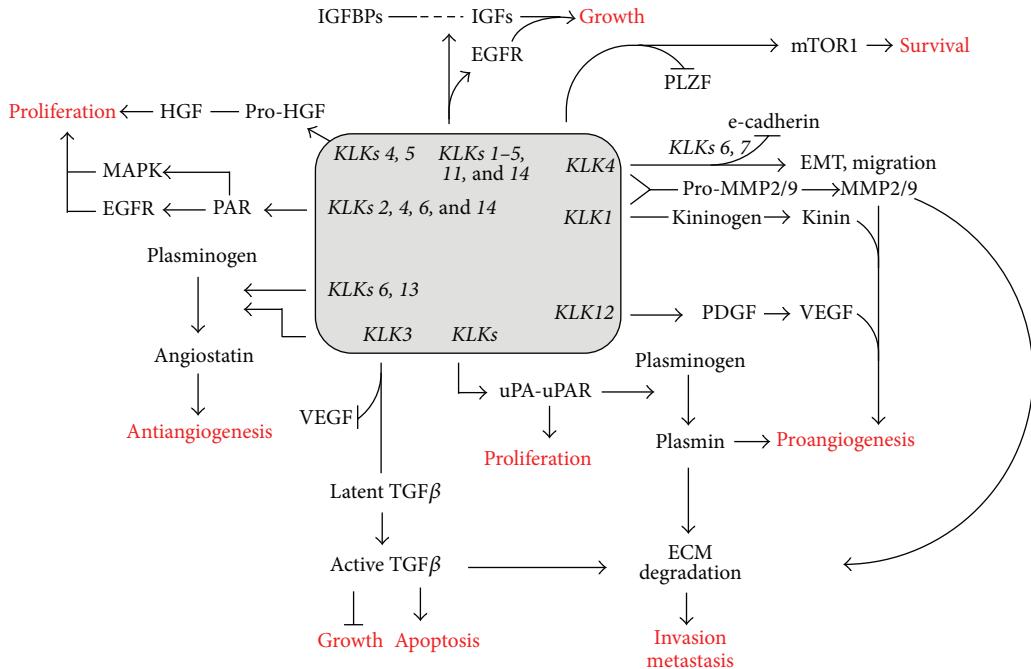


FIGURE 4: Kallikrein-related peptidases and cancer. KLKs participate in proteolytic pathways that contribute to the neoplastic process by facilitating cell proliferation via growth factors and modulating cell survival through mTOR signaling. They can also regulate angiogenesis, cell migration and invasion by angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion, metalloproteinase activation, extracellular matrix (ECM) degradation, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) induction. However, KLKs also have a protective effect against cancer, promoting apoptosis or inhibiting angiogenesis and cell proliferation.

(uPA)/uPA receptor system, which also leads to metalloproteinase activation and extracellular matrix degradation [2]. KLK12 may then promote angiogenesis by the conversion of the membrane-bound platelet-derived growth factor B (PDGF-B) precursor into a soluble form that modulates secretion of the angiogenic vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) [199]. Some KLKs, such as KLKs 3, 6, and 13, have the opposite action by blocking VEGF and/or fibroblast growth factor 2 (FGF2) or generating angiostatin-like fragments from plasminogen, which are potent inhibitors of angiogenesis in vitro [2].

Tumors have an increased acidic microenvironment resulting from accelerated glycolysis and lactate accumulation and thus low pH in the extracellular space [200]. Because an acidic environment may block the kallikrein inhibitor LEKTI, contributing to increased KLK expression and loss of cellular adhesion in skin desquamation, it is reasonable to consider a similar mechanism during neoplastic dissemination [201]. In fact, the metastatic process is associated with a transition from tightly connected cells to cells with increased motility, namely, the epithelial-mesenchymal transition, where KLKs play important roles. For example, KLKs activate latent TGF β , which induces EMT, and are associated with the loss of E-cadherin in tumor cells and thus with decreased cell-cell adhesion [202]. They also trigger extracellular matrix degradation via prometalloprotease activation and hence promote tissue invasion [2].

These examples demonstrate how important kallikrein-related peptidases are in tumor development and progression.

The biological processes in which they participate are related to diseases other than cancer but are directly connected with cancer pathways, including cell proliferation, adhesion, inflammation, and apoptosis.

6. Therapeutic Relevance of KLKs

As discussed in previous sections, KLKs have been associated with different pathologic processes, from skin diseases to neurodegenerative disorders and cancer. The progress in our knowledge on all members of this protein family, functions, 3D structures, substrates, and physiological roles, has provided opportunities to develop new therapeutic approaches for different disorders.

KLKs are targeted by several types of inhibitors, including small-molecule inhibitors, antibody-, protein-, and peptide-based inhibitors, KLK-activated prodrugs, interfering RNAs, and immunotherapeutic vaccines (reviewed by [3]). PROST-VAC, for example, is a prostate cancer vaccine consisting of a KLK3 recombinant vector that contains transgenes for three T-cell costimulatory molecules (TRICOM). This vaccine has demonstrated success in inhibiting, with few side effects, cell proliferation and tumor growth and in improving overall survival [203].

Prodrugs activated by KLKs are another strategy that has been investigated. For instance, KLK3-activated peptides have the ability to target the prostate since most KLK3 is expressed in the gland whereas circulating KLK3 is normally inactivated in plasma by endogenous inhibitors [204]. This

drug has overcome the challenge of specificity, although similar successful results are not always achieved. The reasons for that include the fact that the active sites of members of KLK family are conserved, which hampers drug design. The resolution of 3D structure of KLKs should help in this regard. However, KLKs also have overlapping and even opposing actions, which certainly depend on the physiologic, tissue, and disease context [203].

7. Conclusions

The KLK network is impressive. Its intricate signaling pathways and protein interactions strongly show that this group of proteases contributes to normal and pathological metabolisms. However, despite being intensively studied, there are many gaps in our knowledge on the molecular aspects of the KLK family. For example, there is no doubt that KLK expression deregulation participates in the development of neurodegenerative disorders. But what exactly is its role? Would it be a primary and direct one, promoting erroneously protein degradation, which results in pathogenic fragments? Or would it be one that implies cooperating with specific secretases and other enzymes to generate toxic deposits?

In cancer, it is not clear whether KLKs alterations are driver mutations or deleterious passenger mutations. The fact that similar sets of KLKs are associated with different tumor types and facilitate proliferation, migration, and other cancer hallmarks aligns with driver mutations. Differently, antiproliferative effects of KLKs and similar regulatory factors for different members of this family may argue in favor of random passenger mutations. However, both statements are not mutually exclusive and may occur simultaneously or sequentially. In fact, the idea of sequential occurrence is interesting: considering the complexity of human proteolytic system, it is reasonable to assume that the expression of specific KLKs may counteract the under- or overexpression of other KLKs or enzymes or even that those KLKs are activated, one after the other, to neutralize the expression of a driver mutation, but without success. The analysis of KLK panels in large sets of samples from diverse stages of the disease, including premalignant phases, will probably help to reveal how the expression profile evolves during the course of the disease.

Many questions are still unanswered and the scenario is therefore incomplete. Many more data are necessary to improve our understanding on the function, substrates, and role of KLKs in health and disease in order to distinguish in each case whether they are heroes, villains, or supporting actors.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grant no. FAPESP 10/51168-0); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES); and Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) (Grant no. CNPq 306216/2010-8) for financial support and fellowships. They are also grateful to Mauro Golin for artwork preparation and to GENCAPO (Head and Neck Genome Project, <http://www.gencapo.famerp.br/>) team for the valuable discussions that motivated the present study.

References

- [1] K. M. Heutinck, I. J. M. ten Berge, C. E. Hack, J. Hamann, and A. T. Rowshani, "Serine proteases of the human immune system in health and disease," *Molecular Immunology*, vol. 47, no. 11-12, pp. 1943–1955, 2010.
- [2] C. A. Borgoño and E. P. Diamandis, "The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 11, pp. 876–890, 2004.
- [3] T. Kryza, M. L. Silva, D. Loessner, N. Heuzé-Vourc'h, and J. A. Clements, "The kallikrein-related peptidase family: dysregulation and functions during cancer progression," *Biochimie*, 2015.
- [4] M. Schmitt, V. Magdolen, F. Yang et al., "Emerging clinical importance of the cancer biomarkers kallikrein-related peptidases (KLK) in female and male reproductive organ malignancies," *Radiology and Oncology*, vol. 47, no. 4, pp. 319–329, 2013.
- [5] Y. Dong, D. Loessner, H. Irving-Rodgers, A. Obermair, J. L. Nicklin, and J. A. Clements, "Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 31, no. 1, pp. 135–147, 2014.
- [6] G. M. Yousef, G. M. Yacoub, M.-E. Polymeris, C. Popalis, A. Soosaipillai, and E. P. Diamandis, "Kallikrein gene downregulation in breast cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 90, no. 1, pp. 167–172, 2004.
- [7] G. Sotiropoulou, G. Pampalakis, and E. P. Diamandis, "Functional roles of human Kallikrein-related peptidases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 48, pp. 32989–32994, 2009.
- [8] M. J. Duffy, "PSA in screening for prostate cancer: more good than harm or more harm than good?" *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 66, pp. 1–23, 2014.
- [9] A. Scorilas and K. Mavridis, "Predictions for the future of kallikrein-related peptidases in molecular diagnostics," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 14, no. 6, pp. 713–722, 2014.
- [10] C. López-Otín and J. S. Bond, "Proteases: multifunctional enzymes in life and disease," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 45, pp. 30433–30437, 2008.
- [11] X. S. Puente, A. Gutiérrez-Fernández, G. R. Ordóñez, L. W. Hillier, and C. López-Otín, "Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases," *Genomics*, vol. 86, no. 6, pp. 638–647, 2005.
- [12] X. S. Puente, L. M. Sánchez, C. M. Overall, and C. López-Otín, "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach," *Nature Reviews Genetics*, vol. 4, no. 7, pp. 544–558, 2003.
- [13] X. S. Puente and C. López-Otín, "A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors," *Genome Research*, vol. 14, no. 4, pp. 609–622, 2004.
- [14] V. Quesada, G. Velasco, X. S. Puente, W. C. Warren, and C. López-Otín, "Comparative genomic analysis of the zebra finch degradome provides new insights into evolution of proteases in birds and mammals," *BMC Genomics*, vol. 11, article 220, 2010.
- [15] M. Fujinaga, M. M. Cherney, H. Oyama, K. Oda, and M. N. G. James, "The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*,"

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 10, pp. 3364–3369, 2004.
- [16] N. D. Rawlings, D. P. Tolle, and A. J. Barrett, “MEROPTS: the peptidase database,” *Nucleic Acids Research*, vol. 32, pp. D160–D164, 2004.
- [17] J. E. Fuchs, S. von Graefenstein, R. G. Huber, C. Kramer, and K. R. Liedl, “Substrate-driven mapping of the degradome by comparison of sequence logos,” *PLoS Computational Biology*, vol. 9, no. 11, Article ID e1003353, 2013.
- [18] N. Bergbold and M. K. Lemberg, “Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1828, no. 12, pp. 2840–2848, 2013.
- [19] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, “MEROPTS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors,” *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 1, pp. D343–D350, 2012.
- [20] V. Quesada, G. R. Ordóñez, L. M. Sánchez, X. S. Puente, and C. López-Otín, “The degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis,” *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 1, pp. D239–D243, 2009.
- [21] M. J. Page and E. Di Cera, “Serine peptidases: classification, structure and function,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 7–8, pp. 1220–1236, 2008.
- [22] E. Di Cera, “Serine proteases,” *IUBMB Life*, vol. 61, no. 5, pp. 510–515, 2009.
- [23] S. Saito, K. Murakoshi, S. Kotake, N. Kamatani, and T. Tomatsu, “Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis,” *Journal of Rheumatology*, vol. 35, no. 10, pp. 1932–1943, 2008.
- [24] C. M. Tschopp, N. Spiegl, S. Didichenko et al., “Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma,” *Blood*, vol. 108, no. 7, pp. 2290–2299, 2006.
- [25] H. E. Thomas, J. A. Trapani, and T. W. H. Kay, “The role of perforin and granzymes in diabetes,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 4, pp. 577–585, 2010.
- [26] C. M. Chamberlain and D. J. Granville, “The role of Granzyme B in atheromatous diseases,” *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 85, no. 1, pp. 89–95, 2007.
- [27] D. A. Ngan, S. V. Vickerman, D. J. Granville, S. F. P. Man, and D. D. Sin, “The possible role of granzyme B in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease,” *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, vol. 3, no. 3, pp. 113–129, 2009.
- [28] Y. Saito, H. Kondo, and Y. Hojo, “Granzyme B as a novel factor involved in cardiovascular diseases,” *Journal of Cardiology*, vol. 57, no. 2, pp. 141–147, 2011.
- [29] P. R. Hiebert and D. J. Granville, “Granzyme B in injury, inflammation, and repair,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 18, no. 12, pp. 732–741, 2012.
- [30] W. A. Boivin, D. M. Cooper, P. R. Hiebert, and D. J. Granville, “Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma,” *Laboratory Investigation*, vol. 89, no. 11, pp. 1195–1220, 2009.
- [31] E. Darrah and A. Rosen, “Granzyme B cleavage of autoantigens in autoimmunity,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 4, pp. 624–632, 2010.
- [32] A. Hendel, P. R. Hiebert, W. A. Boivin, S. J. Williams, and D. J. Granville, “Granzymes in age-related cardiovascular and pulmonary diseases,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 4, pp. 596–606, 2010.
- [33] A. Roghanian and J.-M. Sallenave, “Neutrophil elastase (NE) and NE inhibitors: canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease),” *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, vol. 21, no. 1, pp. 125–144, 2008.
- [34] M. L. Fajt and S. E. Wenzel, “Mast cells, their subtypes, and relation to asthma phenotypes,” *Annals of the American Thoracic Society*, vol. 10, supplement, pp. S158–S164, 2013.
- [35] M. R. Namazi, “Possible molecular mechanisms to account for the involvement of tryptase in the pathogenesis of psoriasis,” *Autoimmunity*, vol. 38, no. 6, pp. 449–452, 2005.
- [36] P. T. Kovanen, “Mast cells and degradation of pericellular and extracellular matrices: potential contributions to erosion, rupture and intraplaque haemorrhage of atherosclerotic plaques,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, no. 5, pp. 857–861, 2007.
- [37] C. Overed-Sayer, L. Rapley, T. Mustelin, and D. L. Clarke, “Are mast cells instrumental for fibrotic diseases?” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 4, article 174, Article ID 00174, 2014.
- [38] U. Blank, M. Essig, L. Scandiuzzi, M. Benhamou, and Y. Kanamaru, “Mast cells and inflammatory kidney disease,” *Immunological Reviews*, vol. 217, no. 1, pp. 79–95, 2007.
- [39] E. P. Diamandis, A. Scorilas, T. Kishi et al., “Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia,” *Clinical Biochemistry*, vol. 37, no. 3, pp. 230–237, 2004.
- [40] E. P. Diamandis, G. M. Yousef, C. Petraki, and A. R. Soosaipillai, “Human kallikrein 6 as a biomarker of Alzheimer’s disease,” *Clinical Biochemistry*, vol. 33, no. 8, pp. 663–667, 2000.
- [41] M. Menendez-Gonzalez, P. Castro-Santos, A. Suarez et al., “Value of measuring plasmatic levels of neurosin in the diagnosis of Alzheimer’s disease,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 14, no. 1, pp. 59–67, 2008.
- [42] E. L. Ashby, P. G. Kehoe, and S. Love, “Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer’s disease and vascular dementia,” *Brain Research*, vol. 1363, pp. 1–10, 2010.
- [43] S.-K. Wang, Y. Hu, J. P. Simmer et al., “Novel KLK4 and MMP20 mutations discovered by whole-exome sequencing,” *Journal of Dental Research*, vol. 92, no. 3, pp. 266–271, 2013.
- [44] H.-C. Chan, N. M. R. P. Estrella, R. N. Milkovich, J.-W. Kim, J. P. Simmer, and J. C.-C. Hu, “Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds,” *European Journal of Oral Sciences*, vol. 119, supplement 1, pp. 311–323, 2011.
- [45] S.-K. Lee, F. Seymen, K.-E. Lee et al., “Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization,” *Journal of Dental Research*, vol. 89, no. 12, pp. 1378–1382, 2010.
- [46] E. Martínez-Morillo, A. Diamandis, A. D. Romaschin, and E. P. Diamandis, “Kallikrein 6 as a serum prognostic marker in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e45676, 2012.
- [47] J. Batra, T. O’Mara, R. Patnala, F. Lose, and J. A. Clements, “Genetic polymorphisms in the human tissue *kallikrein (KLK)* locus and their implication in various malignant and non-malignant diseases,” *Biological Chemistry*, vol. 393, no. 12, pp. 1365–1390, 2012.
- [48] R. A. Myers, B. E. Himes, C. R. Gignoux et al., “Further replication studies of the EVE Consortium meta-analysis identifies 2 asthma risk loci in European Americans,” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 130, no. 6, pp. 1294–1301, 2012.

- [49] H. Xie, L. Li, L.-D. Xiong, F. Liao, and G.-R. Zhang, "The changes of skin barrier of patients with different facial dermatitis and the comparison of CE and KLK5," *Journal of Sichuan University*, vol. 44, no. 6, pp. 940–998, 2013.
- [50] P. Fortugno, L. Furio, M. Teson et al., "The 420k LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: implications for atopic dermatitis," *Human Molecular Genetics*, vol. 21, no. 19, pp. 4187–4200, 2012.
- [51] A. Izumi, Y. Iijima, H. Noguchi et al., "Genetic variations of human neutropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions," *Neuropsychopharmacology*, vol. 33, no. 13, pp. 3237–3245, 2008.
- [52] Q. D. Li, F. J. Li, X. C. Liu, and H. Jiang, "Klk1 A1789g gene polymorphism and the risk of coronary artery stenosis in the Chinese population," *Genetics and Molecular Research*, vol. 12, no. 2, pp. 1636–1645, 2013.
- [53] Y.-Y. Yao, C. Fu, G.-S. Ma et al., "Tissue kallikrein is related to the severity of coronary artery disease," *Clinica Chimica Acta*, vol. 423, pp. 90–98, 2013.
- [54] P. Susantitaphong, M. C. Perianayagam, S. W. Kang et al., "Association of functional kallikrein-1 promoter polymorphisms and acute kidney injury: a case-control and longitudinal cohort study," *Nephron. Clinical practice*, vol. 122, no. 3-4, pp. 107–113, 2012.
- [55] K. Liu, Q.-Z. Li, A. M. Delgado-Vega et al., "Kallikrein genes are associated with lupus and glomerular basement membrane-specific antibody-induced nephritis in mice and humans," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 4, pp. 911–923, 2009.
- [56] W. H. Yiu, D. W. L. Wong, L. Y. Y. Chan et al., "Tissue kallikrein mediates pro-inflammatory pathways and activation of protease-activated receptor-4 in proximal tubular epithelial cells," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, Article ID e88894, 2014.
- [57] J. E. Burda, M. Radulovic, H. Yoon, and I. A. Scarisbrick, "Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendroglialopathy," *Glia*, vol. 61, no. 9, pp. 1456–1470, 2013.
- [58] I. A. Scarisbrick, H. Yoon, M. Panos et al., "Kallikrein 6 regulates early CNS demyelination in a viral model of multiple sclerosis," *Brain Pathology*, vol. 22, no. 5, pp. 709–722, 2012.
- [59] A. L. O. Hebb, V. Bhan, A. D. Wishart, C. S. Moore, and G. S. Robertson, "Human kallikrein 6 cerebrospinal levels are elevated in multiple sclerosis," *Current Drug Discovery Technologies*, vol. 7, no. 2, pp. 137–140, 2010.
- [60] M. Wennström, Y. Surova, S. Hall et al., "Low CSF levels of both α -synuclein and the α -synuclein cleaving enzyme neurosin in patients with synucleinopathy," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e53250, 2013.
- [61] H. Yoon, M. Radulovic, J. Wu et al., "Kallikrein 6 signals through PAR1 and PAR2 to promote neuron injury and exacerbate glutamate neurotoxicity," *Journal of Neurochemistry*, vol. 127, no. 2, pp. 283–298, 2013.
- [62] M. Radulovic, H. Yoon, N. Larson et al., "Kallikrein cascades in traumatic spinal cord injury: in vitro evidence for roles in axonopathy and neuron degeneration," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 72, no. 11, pp. 1072–1089, 2013.
- [63] I. A. Scarisbrick, M. Radulovic, J. E. Burda et al., "Kallikrein 6 is a novel molecular trigger of reactive astrogliosis," *Biological Chemistry*, vol. 393, no. 5, pp. 355–367, 2012.
- [64] A. V. Rawlings and R. Voegeli, "Stratum corneum proteases and dry skin conditions," *Cell and Tissue Research*, vol. 351, no. 2, pp. 217–235, 2013.
- [65] A. Briot, M. Lacroix, A. Robin, M. Steinhoff, C. Deraison, and A. Hovnanian, "Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in netherton syndrome adult mouse model," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 130, no. 12, pp. 2736–2742, 2010.
- [66] H. D. de Koning, E. H. van den Bogaard, J. G. M. Bergboer et al., "Expression profile of cornified envelope structural proteins and keratinocyte differentiation-regulating proteins during skin barrier repair," *British Journal of Dermatology*, vol. 166, no. 6, pp. 1245–1254, 2012.
- [67] J. Kanitakis, V. Lora, B. Chouvet, G. Zambruno, M. Haftek, and M. Faure, "Circumscribed palmo-plantar hyperkeratosis: a disease of desquamation? Immunohistological study of five cases and literature review," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 25, no. 3, pp. 296–301, 2011.
- [68] K. Shingaki, S. Matsuzaki, M. Taniguchi et al., "Molecular mechanism of kallikrein-related peptidase 8/neutropsin-induced hyperkeratosis in inflamed skin," *British Journal of Dermatology*, vol. 163, no. 3, pp. 466–475, 2010.
- [69] K. Shingaki, M. Taniguchi, S. Kanazawa et al., "NGF-p75 and neutropsin/KLK8 pathways stimulate each other to cause hyperkeratosis and acanthosis in inflamed skin," *Journal of Dermatological Science*, vol. 67, no. 1, pp. 71–73, 2012.
- [70] A. Hovnanian, "Netherton syndrome: skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition," *Cell and Tissue Research*, vol. 351, no. 2, pp. 289–300, 2013.
- [71] L. Furio, S. de Veer, M. Jaillet et al., "Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 211, no. 3, pp. 499–513, 2014.
- [72] A. Briot, C. Deraison, M. Lacroix et al., "Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 5, pp. 1135–1147, 2009.
- [73] K. Yamasaki and R. L. Gallo, "Rosacea as a disease of cathelicidins and skin innate immunity," *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, vol. 15, no. 1, pp. 12–15, 2011.
- [74] A. Eissa, D. Cretu, A. Soosaipillai et al., "Serum kallikrein-8 correlates with skin activity, but not psoriatic arthritis, in patients with psoriatic disease," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 2, pp. 317–325, 2013.
- [75] N. Komatsu, K. Saijoh, C. Kuk, F. Shirasaki, K. Takehara, and E. P. Diamandis, "Aberrant human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of patients with psoriasis: dependence on phenotype, severity and therapy," *British Journal of Dermatology*, vol. 156, no. 5, pp. 875–883, 2007.
- [76] M. Ximerakis, G. Pampalakis, T. I. Roumeliotis et al., "Resistance of naturally secreted α -synuclein to proteolysis," *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 7, pp. 3146–3158, 2014.
- [77] J. El Annan, G. Jiang, D. Wang, J. Zhou, G. N. Foulks, and H. Shao, "Elevated immunoglobulin to tissue KLK11 in patients with Sjögren syndrome," *Cornea*, vol. 32, no. 5, pp. e90–e93, 2013.
- [78] M. Avgeris, K. Mavridis, and A. Scorilas, "Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance," *Biological Chemistry*, vol. 393, no. 5, pp. 301–317, 2012.
- [79] M. Kioulafa, L. Kaklamani, E. Stathopoulos, D. Mavroudis, V. Georgoulias, and E. S. Lianidou, "Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer," *Annals of Oncology*, vol. 20, no. 6, pp. 1020–1025, 2009.

- [80] G. Pampalakis, E. Prosnikli, T. Agalioti, A. Vlahou, V. Zoumpourlis, and G. Sotiropoulou, "A tumor-protective role for Human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition," *Cancer Research*, vol. 69, no. 9, pp. 3779–3787, 2009.
- [81] M. Talieri, M. Devetzi, A. Scorilas et al., "Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants expression in breast cancer and their clinical impact," *Tumour Biology*, vol. 33, no. 4, pp. 1075–1084, 2012.
- [82] K. Michaelidou, A. Ardashianis, and A. Scorilas, "Clinical relevance of the deregulated kallikrein-related peptidase 8 mRNA expression in breast cancer: a novel independent indicator of disease-free survival," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 152, no. 2, pp. 323–336, 2015.
- [83] M. Talieri, M. Devetzi, A. Scorilas et al., "Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 expression," *Anticancer Research*, vol. 31, no. 9, pp. 3093–3100, 2011.
- [84] A. D. Santin, S. Cane, S. Bellone et al., "The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells," *Gynecologic Oncology*, vol. 94, no. 2, pp. 283–288, 2004.
- [85] L. Termini, P. C. Maciag, F. A. Soares et al., "Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia," *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 2, pp. 485–490, 2010.
- [86] C. K. Kontos, D. Chantzis, I. N. Papadopoulos, and A. Scorilas, "Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA predicts short-term relapse in colorectal adenocarcinoma patients," *Cancer Letters*, vol. 330, no. 1, pp. 106–112, 2013.
- [87] S. Christodoulou, D. K. Alexopoulou, C. K. Kontos, A. Scorilas, and I. N. Papadopoulos, "Kallikrein-related peptidase-6 (KLK6) mRNA expression is an independent prognostic tissue biomarker of poor disease-free and overall survival in colorectal adenocarcinoma," *Tumor Biology*, vol. 35, no. 5, pp. 4673–4685, 2014.
- [88] M. Talieri, K. Mathioudaki, P. Prezas et al., "Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 101, no. 4, pp. 741–747, 2009.
- [89] D. K. Alexopoulou, I. N. Papadopoulos, and A. Scorilas, "Clinical significance of kallikrein-related peptidase (KLK10) mRNA expression in colorectal cancer," *Clinical Biochemistry*, vol. 46, no. 15, pp. 1453–1461, 2013.
- [90] B. Feng, W.-B. Xu, M.-H. Zheng et al., "Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 21, no. 10, pp. 1596–1603, 2006.
- [91] W. Huang, J. Zhong, L. Wu et al., "Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer," *Cancer Letters*, vol. 251, no. 1, pp. 78–85, 2007.
- [92] X. Jiao, H.-J. Lu, M.-M. Zhai et al., "Overexpression of kallikrein gene 10 is a biomarker for predicting poor prognosis in gastric cancer," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 48, pp. 9425–9431, 2013.
- [93] M. Devetzi, T. Trangas, A. Scorilas, D. Xynopoulos, and M. Talieri, "Parallel overexpression and clinical significance of kallikrein-related peptidases 7 and 14 (KLK7/KLK14) in colon cancer," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 109, no. 4, pp. 716–725, 2013.
- [94] Y.-G. Wen, Q. Wang, C.-Z. Zhou et al., "Identification and validation of Kallikrein-related peptidase 11 as a novel prognostic marker of gastric cancer based on immunohistochemistry," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 104, no. 5, pp. 516–524, 2011.
- [95] G. Konstantoudakis, D. Florou, K. Mavridis, I. N. Papadopoulos, and A. Scorilas, "Kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene expression status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas," *Clinical Biochemistry*, vol. 43, no. 15, pp. 1205–1211, 2010.
- [96] M. J. Worsham, K. M. Chen, V. Meduri et al., "Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma," *Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, vol. 132, no. 6, pp. 668–677, 2006.
- [97] J. R. Pettus, J. J. Johnson, Z. Shi et al., "Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity," *Histology and Histopathology*, vol. 24, no. 2, pp. 197–207, 2009.
- [98] C.-J. Liu, T.-Y. Liu, L.-T. Kuo et al., "Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma," *The Journal of Pathology*, vol. 214, no. 4, pp. 489–497, 2008.
- [99] H. Zhao, Y. Dong, J. Quan et al., "Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma," *Head and Neck*, vol. 33, no. 4, pp. 566–572, 2011.
- [100] M. Talieri, M. Zoma, M. Devetzi, A. Scorilas, and A. Ardashianis, "Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) gene expression in intracranial tumors," *Tumor Biology*, vol. 33, no. 5, pp. 1375–1383, 2012.
- [101] P. Prezas, A. Scorilas, C. Yfanti et al., "The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies," *Biological Chemistry*, vol. 387, no. 12, pp. 1607–1612, 2006.
- [102] C. Planque, L. Li, Y. Zheng et al., "A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5, pp. 1355–1362, 2008.
- [103] C. Planque, Y.-H. Choi, S. Guyetant, N. Heuzé-Vourc'h, L. Briollais, and Y. Courty, "Alternative splicing variant of kallikrein-related peptidase 8 as an independent predictor of unfavorable prognosis in lung cancer," *Clinical Chemistry*, vol. 56, no. 6, pp. 987–997, 2010.
- [104] J. Singh, A. Naran, N. L. Misso, P. J. Rigby, P. J. Thompson, and K. D. Bhoola, "Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma," *International Immunopharmacology*, vol. 8, no. 2, pp. 300–306, 2008.
- [105] Y.-P. Sher, C.-C. Chou, R.-H. Chou et al., "Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness," *Cancer Research*, vol. 66, no. 24, pp. 11763–11770, 2006.
- [106] Y. Zhang, R. Wang, H. Song et al., "Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer," *Cancer Letters*, vol. 303, no. 1, pp. 21–28, 2011.
- [107] S. Krenzer, H. Peterziel, C. Mauch et al., "Expression and function of the kallikrein-related peptidase 6 in the human melanoma microenvironment," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 131, no. 11, pp. 2281–2288, 2011.
- [108] W. K. Martins, G. H. Esteves, O. M. Almeida et al., "Gene network analyses point to the importance of human tissue kallikreins in melanoma progression," *BMC Medical Genomics*, vol. 4, article 76, 2011.
- [109] K. Oikonomopoulou, A. Scorilas, I. P. Michael et al., "Kallikreins as markers of disseminated tumour cells in ovarian

- cancer—a pilot study,” *Tumor Biology*, vol. 27, no. 2, pp. 104–114, 2006.
- [110] D. Loessner, V. M. C. Quent, J. Kraemer et al., “Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance,” *Gynecologic Oncology*, vol. 127, no. 3, pp. 569–578, 2012.
- [111] J. Dorn, N. Harbeck, R. Kates et al., “Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer,” *Annals of Oncology*, vol. 22, no. 4, pp. 877–883, 2011.
- [112] J. Dorn, V. Magdolen, A. Gkazepis et al., “Circulating biomarker tissue kallikrein-related peptidase KLK5 impacts ovarian cancer patients’ survival,” *Annals of Oncology*, vol. 22, no. 8, pp. 1783–1790, 2011.
- [113] E. Bandiera, L. Zanotti, A. S. C. Fabricio et al., “Cancer antigen 125, human epididymis 4, kallikrein 6, osteopontin and soluble mesothelin-related peptide immunocomplexed with immunoglobulin M in epithelial ovarian cancer diagnosis,” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 9, pp. 1815–1824, 2013.
- [114] S. Sarojini, A. Tamir, H. Lim et al., “Early detection biomarkers for ovarian cancer,” *Journal of Oncology*, vol. 2012, Article ID 709049, 15 pages, 2012.
- [115] S. C. L. Koh, K. Razvi, Y. H. Chan et al., “The association with age, human tissue kallikreins 6 and 10 and hemostatic markers for survival outcome from epithelial ovarian cancer,” *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 284, no. 1, pp. 183–190, 2011.
- [116] C. G. Gunawardana, C. Kuk, C. R. Smith, I. Batruch, A. Soosaipillai, and E. P. Diamandis, “Comprehensive analysis of conditioned media from ovarian cancer cell lines identifies novel candidate markers of epithelial ovarian cancer,” *Journal of Proteome Research*, vol. 8, no. 10, pp. 4705–4713, 2009.
- [117] A. Psyrra, P. Kountourakis, A. Scorilas et al., “Human tissue kallikrein 7, a novel biomarker for advanced ovarian carcinoma using a novel *in situ* quantitative method of protein expression,” *Annals of Oncology*, vol. 19, no. 7, pp. 1271–1277, 2008.
- [118] P. Kountourakis, A. Psyrra, A. Scorilas et al., “Expression and prognostic significance of kallikrein-related peptidase 8 protein levels in advanced ovarian cancer by using automated quantitative analysis,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 101, no. 3, pp. 541–546, 2009.
- [119] C. A. Borgoño, T. Kishi, A. Scorilas et al., “Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 5, pp. 1487–1493, 2006.
- [120] G. M. Yousef, L. G. Kyriakopoulou, A. Scorilas et al., “Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: a new independent and favorable prognostic marker,” *Cancer Research*, vol. 61, no. 21, pp. 7811–7818, 2001.
- [121] J. Batra, O. L. Tan, T. O’Mara et al., “Kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) expression and single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer survival,” *International Journal of Gynecological Cancer*, vol. 20, no. 4, pp. 529–536, 2010.
- [122] C. A. Borgoño, S. Fracchioli, G. M. Yousef et al., “Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma,” *International Journal of Cancer*, vol. 106, no. 4, pp. 605–610, 2003.
- [123] A. Scorilas, C. A. Borgono, N. Harbeck et al., “Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 22, pp. 678–685, 2004.
- [124] G. M. Yousef, S. Fracchioli, A. Scorilas et al., “Steroid hormone regulation and prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer,” *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 119, no. 3, pp. 346–355, 2003.
- [125] J. Batra, C. M. Nagle, T. O’Mara et al., “A Kallikrein 15 (KLK15) single nucleotide polymorphism located close to a novel exon shows evidence of association with poor ovarian cancer survival,” *BMC Cancer*, vol. 11, article 119, 2011.
- [126] V. Iakovlev, E. R. Siegel, M.-S. Tsao, and R. S. Haun, “Expression of kallikrein-related peptidase 7 predicts poor prognosis in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 21, no. 7, pp. 1135–1142, 2012.
- [127] M. G. Lawrence, J. Lai, and J. A. Clements, “Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus,” *Endocrine Reviews*, vol. 31, no. 4, pp. 407–446, 2010.
- [128] T. L. Veveris-Lowe, S. J. Kruger, T. Walsh, R. A. Gardiner, and J. A. Clements, “Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: Kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches,” *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 33, no. 1, pp. 87–99, 2007.
- [129] K. J. O’Malley, K. Eisermann, L. E. Pascal et al., “Proteomic analysis of patient tissue reveals PSA protein in the stroma of benign prostatic hyperplasia,” *Prostate*, vol. 74, no. 8, pp. 892–900, 2014.
- [130] D. L. J. Thorek, M. J. Evans, S. V. Carlsson, D. Ulmert, and H. Lilja, “Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 110, no. 3, pp. 484–492, 2013.
- [131] Á. Borque, J. del Amo, L. M. Esteban et al., “Genetic predisposition to early recurrence in clinically localized prostate cancer,” *BJU International*, vol. 111, no. 4, pp. 549–558, 2013.
- [132] M. Kohli, P. G. Rothberg, C. Feng et al., “Exploratory study of a KLK2 polymorphism as a prognostic marker in prostate cancer,” *Cancer Biomarkers*, vol. 7, no. 2, pp. 101–108, 2010.
- [133] R. K. Nam, W. W. Zhang, L. H. Klotz et al., “Variants of the hK2 protein gene (KLK2) are associated with serum hK2 levels and predict the presence of prostate cancer at biopsy,” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 21, pp. 6452–6458, 2006.
- [134] A. Amaro, A. I. Esposito, A. Gallina et al., “Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 33, no. 2, pp. 657–671, 2014.
- [135] I. M. Shui, S. Lindström, A. S. Kibel et al., “Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the national cancer institute breast and prostate cancer cohort consortium,” *European Urology*, vol. 65, no. 6, pp. 1069–1075, 2014.
- [136] A. Soni, A. Bansal, A. K. Mishra et al., “Association of androgen receptor, prostate-specific antigen, and CYP19 gene polymorphisms with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia in a north Indian population,” *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, vol. 16, no. 8, pp. 835–840, 2012.
- [137] E. M. Kwon, S. K. Holt, R. Fu et al., “Androgen metabolism and JAK/STAT pathway genes and prostate cancer risk,” *Cancer Epidemiology*, vol. 36, no. 4, pp. 347–353, 2012.
- [138] S. Nobata, A. Hishida, M. Naito et al., “Association between KLK3 rs2735839 G/A polymorphism and serum PSA levels in Japanese men,” *Urologia Internationalis*, vol. 89, no. 1, pp. 39–44, 2012.

- [139] K. L. Penney, F. R. Schumacher, P. Kraft et al., “Association of KLK3 (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels,” *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 6, pp. 853–859, 2011.
- [140] K. Mavridis and A. Scorilas, “Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies,” *Future Oncology*, vol. 6, no. 2, pp. 269–285, 2010.
- [141] K. Mavridis, K. Stravodimos, and A. Scorilas, “Quantified KLK15 gene expression levels discriminate prostate cancer from benign tumors and constitute a novel independent predictor of disease progression,” *Prostate*, vol. 73, no. 11, pp. 1191–1201, 2013.
- [142] F. Lose, S. Srinivasan, T. O’Mara et al., “Genetic association of the KLK4 locus with risk of prostate cancer,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e44520, 2012.
- [143] F. Lose, J. Batra, T. O’Mara et al., “Common variation in *Kallikrein* genes KLK5, KLK6, KLK12, and KLK13 and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness,” *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, vol. 31, no. 5, pp. 635–643, 2013.
- [144] L. Mo, J. Zhang, J. Shi et al., “Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression,” *Anticancer Research*, vol. 30, no. 9, pp. 3413–3420, 2010.
- [145] X. Bi, H. He, Y. Ye et al., “Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer,” *Medical Oncology*, vol. 27, no. 1, pp. 145–151, 2010.
- [146] F. Lose, M. G. Lawrence, S. Srinivasan et al., “The kallikrein 14 gene is down-regulated by androgen receptor signalling and harbours genetic variation that is associated with prostate tumour aggressiveness,” *Biological Chemistry*, vol. 393, no. 5, pp. 403–412, 2012.
- [147] A. Kaushal, S. A. Myers, Y. Dong et al., “A novel transcript from the KLKP1 gene is androgen regulated, down-regulated during prostate cancer progression and encodes the first non-serine protease identified from the human kallikrein gene locus,” *Prostate*, vol. 68, no. 4, pp. 381–399, 2008.
- [148] J. Björkqvist, A. Jämsä, and T. Renné, “Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 110, no. 3, pp. 399–407, 2013.
- [149] G. M. Yousef, A. Chang, A. Scorilas, and E. P. Diamandis, “Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 276, no. 1, pp. 125–133, 2000.
- [150] G. M. Yousef and E. P. Diamandis, “An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers,” *Clinical Biochemistry*, vol. 36, no. 6, pp. 443–452, 2003.
- [151] G. M. Yousef, C. A. Borgono, I. P. Michael, and E. P. Diamandis, “Cloning of a kallikrein pseudogene,” *Clinical Biochemistry*, vol. 37, no. 11, pp. 961–967, 2004.
- [152] J. C.-C. Hu, C. Zhang, X. Sun et al., “Characterization of the mouse and human PRSS17 genes, their relationship to other serine proteases, and the expression of PRSS17 in developing mouse incisors,” *Gene*, vol. 251, no. 1, pp. 1–8, 2000.
- [153] A. Pavlopoulou, G. Pampalakis, I. Michalopoulos, and G. Sotiropoulou, “Evolutionary history of tissue kallikreins,” *PLoS ONE*, vol. 5, no. 11, Article ID e13781, 2010.
- [154] M. Hasegawa, H. Kishino, and T.-A. Yano, “Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA,” *Journal of Molecular Evolution*, vol. 22, no. 2, pp. 160–174, 1985.
- [155] V. L. Koumandou and A. Scorilas, “Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, Article ID e68074, 2013.
- [156] M. B. Elliott, D. M. Irwin, and E. P. Diamandis, “In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families,” *Genomics*, vol. 88, no. 5, pp. 591–599, 2006.
- [157] Å. Lundwall, “Old genes and new genes: the evolution of the kallikrein locus,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 110, no. 3, pp. 469–475, 2013.
- [158] Y. Luo, P. Kumar, and C. R. Mendelson, “Estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) regulates oxygen-dependent expression of voltage-gated potassium (K⁺) channels and tissue kallikrein during human trophoblast differentiation,” *Molecular Endocrinology*, vol. 27, no. 6, pp. 940–952, 2013.
- [159] D. N. Son, L. Li, H. Katsuyama et al., “Abundant expression of Kallikrein 1 gene in human keratinocytes was mediated by GATA3,” *Gene*, vol. 436, no. 1-2, pp. 121–127, 2009.
- [160] M. Zeng, Y. Zhang, I. Bhat, D. E. Wazer, H. Band, and V. Band, “The human kallikrein 10 promoter contains a functional retinoid response element,” *Biological Chemistry*, vol. 387, no. 6, pp. 741–747, 2006.
- [161] T. Shin, H. Sumiyoshi, N. Matsuo et al., “Sp1 and Sp3 transcription factors upregulate the proximal promoter of the human prostate-specific antigen gene in prostate cancer cells,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 435, no. 2, pp. 291–302, 2005.
- [162] K. Eisermann, S. Tandon, A. Bazarov, A. Brett, G. Fraizer, and H. Piontkivska, “Evolutionary conservation of zinc finger transcription factor binding sites in promoters of genes co-expressed with WT1 in prostate cancer,” *BMC Genomics*, vol. 9, article 337, 2008.
- [163] K.-H. Tsui, P.-L. Chang, H.-T. Lin, and H.-H. Juang, “Down-regulation of the prostate specific antigen promoter by p53 in human prostate cancer cells,” *Journal of Urology*, vol. 172, no. 5 I, pp. 2035–2039, 2004.
- [164] B. Cinar, F. Yeung, H. Konaka et al., “Identification of a negative regulatory cis-element in the enhancer core region of the prostate-specific antigen promoter: implications for intersection of androgen receptor and nuclear factor- κ B signalling in prostate cancer cells,” *Biochemical Journal*, vol. 379, no. 2, pp. 421–431, 2004.
- [165] C. A. Borgoño, I. P. Michael, and E. P. Diamandis, “Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer,” *Molecular Cancer Research*, vol. 2, no. 5, pp. 257–280, 2004.
- [166] M. D. Pasic, E. Olkhov, B. Bapat, and G. M. Yousef, “Epigenetic regulation of kallikrein-related peptidases: there is a whole new world out there,” *Biological Chemistry*, vol. 393, no. 5, pp. 319–330, 2012.
- [167] J. Roman-Gomez, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre et al., “The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia,” *Leukemia*, vol. 18, no. 2, pp. 362–365, 2004.
- [168] B. Li, J. Goyal, S. Dhar et al., “CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression,” *Cancer Research*, vol. 61, no. 21, pp. 8014–8021, 2001.
- [169] E. Olkhov-Mitsel, T. Van der Kwast, K. J. Kron et al., “Quantitative DNA methylation analysis of genes coding for kallikrein-related peptidases 6 and 10 as biomarkers for prostate cancer,” *Epigenetics*, vol. 7, no. 9, pp. 1037–1045, 2012.
- [170] B. Bharaj, A. Scorilas, E. P. Diamandis et al., “Breast cancer prognostic significance of a single nucleotide polymorphism in

- the proximal androgen response element of the prostate specific antigen gene promoter," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 61, no. 2, pp. 111–119, 2000.
- [171] Q. Song, J. Chao, and L. Chao, "DNA polymorphisms in the 5'-flanking region of the human tissue kallikrein gene," *Human Genetics*, vol. 99, no. 6, pp. 727–734, 1997.
- [172] L. Kurlender, C. Borgono, I. P. Michael et al., "A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes," *Biochimica et Biophysica Acta—Reviews on Cancer*, vol. 1755, no. 1, pp. 1–14, 2005.
- [173] B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson, and D. M. Blow, "Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin," *Nature*, vol. 214, no. 5089, pp. 652–656, 1967.
- [174] A. M. Lesk and W. D. Fordham, "Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family," *Journal of Molecular Biology*, vol. 258, no. 3, pp. 501–537, 1996.
- [175] J. Chao, B. Shen, L. Gao, C.-F. Xia, G. Bledsoe, and L. Chao, "Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing," *Biological Chemistry*, vol. 391, no. 4, pp. 345–355, 2010.
- [176] C. Ponticelli and P. L. Meroni, "Kallikreins and lupus nephritis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 4, pp. 768–771, 2009.
- [177] E. P. Diamandis, G. M. Yousef, L.-Y. Luo, A. Magklara, and C. V. Obiezu, "The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 11, no. 2, pp. 54–60, 2000.
- [178] J. L. V. Shaw and E. P. Diamandis, "Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids," *Clinical Chemistry*, vol. 53, no. 8, pp. 1423–1432, 2007.
- [179] N. Komatsu, B. Tsai, M. Sidiropoulos et al., "Quantification of eight tissue kallikreins in the stratum corneum and sweat," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 126, no. 4, pp. 925–929, 2006.
- [180] B. A. Laflamme and M. F. Wolfner, "Identification and function of proteolysis regulators in seminal fluid," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 80, no. 2, pp. 80–101, 2013.
- [181] H. Yoon, S. I. Blaber, W. Li, I. A. Scarisbrick, and M. Blaber, "Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases," *Biological Chemistry*, vol. 394, no. 1, pp. 137–147, 2013.
- [182] A. Serrano-Pozo, M. P. Frosch, E. Masliah, and B. T. Hyman, "Neuropathological alterations in Alzheimer disease," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 1, no. 1, Article ID a006189, 2011.
- [183] M. Goedert, "NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: the prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein," *Science*, vol. 349, no. 6248, Article ID 1255555, 2015.
- [184] S. Mitsui, A. Okui, H. Uemura et al., "Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as a possible new risk factor for Alzheimer's disease," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 977, pp. 216–223, 2002.
- [185] M. Zarghooni, A. Soosaipillai, L. Grass, A. Scorilas, N. Mirazimi, and E. P. Diamandis, "Decreased concentration of human kallikrein 6 in brain extracts of Alzheimer's disease patients," *Clinical Biochemistry*, vol. 35, no. 3, pp. 225–231, 2002.
- [186] T. D. Shropshire, J. Reifert, S. Rajagopalan, D. Baker, S. C. Feinstein, and P. S. Daugherty, "Amyloid β peptide cleavage by kallikrein 7 attenuates fibril growth and rescues neurons from A β -mediated toxicity in vitro," *Biological Chemistry*, vol. 395, no. 1, pp. 109–118, 2014.
- [187] J. Bayani and E. P. Diamandis, "The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6)," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 50, no. 2, pp. 211–233, 2012.
- [188] E. Emmanouilidou, K. Melachroinou, T. Roumeliotis et al., "Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival," *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 20, pp. 6838–6851, 2010.
- [189] C. Kim, D.-H. Ho, J.-E. Suk et al., "Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia," *Nature Communications*, vol. 4, article 1562, 2013.
- [190] H. Tatebe, Y. Watanabe, T. Kasai et al., "Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells," *Neuroscience Research*, vol. 67, no. 4, pp. 341–346, 2010.
- [191] T. Kasai, T. Tokuda, N. Yamaguchi et al., "Cleavage of normal and pathological forms of α -synuclein by neurosin in vitro," *Neuroscience Letters*, vol. 436, no. 1, pp. 52–56, 2008.
- [192] I. A. Scarisbrick, R. Linbo, A. G. Vandell et al., "Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration," *Biological Chemistry*, vol. 389, no. 6, pp. 739–745, 2008.
- [193] G. Naffah-Mazzacoratti Mda, T. L. Gouveia, P. S. Simoes, and S. R. Perosa, "What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders?" *World Journal of Biological Chemistry*, vol. 5, pp. 130–140, 2014.
- [194] Z. Lu, Q. Yang, M. Cui et al., "Tissue kallikrein induces SH-SY5Y cell proliferation via epidermal growth factor receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 446, no. 1, pp. 25–29, 2014.
- [195] Y. Jin, S. Qu, M. Tesikova et al., "Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mTOR signaling in prostate cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 28, pp. E2572–E2581, 2013.
- [196] O. A. Stone, C. Richer, C. Emanueli et al., "Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, no. 5, pp. 657–664, 2009.
- [197] P. Dominek, P. Campagnolo, M. H-Zadeh et al., "Role of human tissue kallikrein in gastrointestinal stromal tumour invasion," *British Journal of Cancer*, vol. 103, no. 9, pp. 1422–1431, 2010.
- [198] G. Spinetti, O. Fortunato, D. Cordella et al., "Tissue Kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells," *Circulation Research*, vol. 108, no. 3, pp. 284–293, 2011.
- [199] T. Kryza, C. Achard, C. Parent et al., "Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting via a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway," *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 2, pp. 740–751, 2014.
- [200] F. Hirschhaeuser, U. G. A. Sattler, and W. Mueller-Klieser, "Lactate: a metabolic key player in cancer," *Cancer Research*, vol. 71, no. 22, pp. 6921–6925, 2011.
- [201] R. Jiang, Z. Shi, J. J. Johnson, Y. Liu, and M. S. Stack, "Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 11, pp. 9127–9135, 2011.
- [202] T. L. Veveris-Lowe, M. G. Lawrence, R. L. Collard et al., "Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 12, no. 3, pp. 631–643, 2005.

- [203] I. Prassas, A. Eissa, G. Poda, and E. P. Diamandis, "Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 14, no. 3, pp. 183–202, 2015.
- [204] G. Sotiropoulou and G. Pampalakis, "Targeting the kallikrein-related peptidases for drug development," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 33, no. 12, pp. 623–634, 2012.
- [205] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, 2011.
- [206] J. Felsenstein, "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap," *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783–791, 1985.



Original article

HNdb: an integrated database of gene and protein information on head and neck squamous cell carcinoma

Tiago Henrique¹, Nelson José Freitas da Silveira²,
Arthur Henrique Cunha Volpato¹, Mayra Mataruco Mioto³,
Ana Carolina Buzzo Stefanini^{1,4}, Adil Bachir Fares¹,
João Gustavo da Silva Castro Andrade¹, Carolina Masson¹,
Rossana Verónica Mendoza López⁵, Fabio Daumas Nunes⁶,
Luis Paulo Kowalski⁷, Patricia Severino⁸ and Eloiza Helena Tajara^{1,4,*}

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine of São José do Rio Preto, SP, Brazil Av Brigadeiro Faria Lima n° 5416 Vila São Pedro 15090-000 - São José do Rio Preto, SP - Brazil, ²Institute of Exact Science, Federal University of Alfenas, MG, Brazil, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Centro 37130-000 - Alfenas, MG - Brazil, ³Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases, School of Medicine of São José do Rio Preto, SP, Brazil Av Brigadeiro Faria Lima n° 5416 Vila São Pedro 15090-000 - São José do Rio Preto, SP - Brazil, ⁴Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, SP, Brazil R. do Matão Butantã 05508-090 - São Paulo, SP, Brazil, ⁵State of São Paulo Cancer Institute – ICESP, SP, Brazil Av. Dr. Arnaldo, 251 Pacaembu 01246-000 - São Paulo, SP - Brazil, ⁶Department of Stomatology School of Dentistry, University of São Paulo, SP, Brazil Avenida Professor Lineu Prestes, 2227 Butantã 05508-000 - São Paulo, SP - Brazil, ⁷Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, Cancer Hospital A.C. Camargo, SP, Brazil Rua Prof Antonio Prudente, 211 Liberdade 01509-010 - São Paulo, SP - Brazil and ⁸Albert Einstein Research and Education Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, SP, Brazil Av. Albert Einstein, 627 Morumbi 05652-000 - São Paulo, SP - Brazil

*Corresponding author: Tel: +55 17 3201 5737; Fax: +55 17 3227 6201; E-mail: tajara@famerp.br

Citation details: Henrique,T., da Silveira,N.J.F., Cunha Volpato,A.H. et al. HNdb: an integrated database of gene and protein information on head and neck squamous cell carcinoma. Database (2016) Vol. 2016: article ID baw026; doi:10.1093/database/baw026

Received 3 September 2015; Revised 15 February 2016; Accepted 19 February 2016

Abstract

The total amount of scientific literature has grown rapidly in recent years. Specifically, there are several million citations in the field of cancer. This makes it difficult, if not impossible, to manually retrieve relevant information on the mechanisms that govern tumor behavior or the neoplastic process. Furthermore, cancer is a complex disease or, more accurately, a set of diseases. The heterogeneity that permeates many tumors is particularly evident in head and neck (HN) cancer, one of the most common types of cancer worldwide. In this study, we present HNdb, a free database that aims to provide a unified and comprehensive

resource of information on genes and proteins involved in HN squamous cell carcinoma, covering data on genomics, transcriptomics, proteomics, literature citations and also cross-references of external databases. Different literature searches of MEDLINE abstracts were performed using specific Medical Subject Headings (MeSH terms) for oral, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. A curated gene-to-publication assignment yielded a total of 1370 genes related to HN cancer. The diversity of results allowed identifying novel and mostly unexplored gene associations, revealing, for example, that processes linked to response to steroid hormone stimulus are significantly enriched in genes related to HN carcinomas. Thus, our database expands the possibilities for gene networks investigation, providing potential hypothesis to be tested.

Database URL: <http://www.gencapo.famerp.br/hndb>

Introduction

The high-throughput ‘omics’ technologies (genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics) and advanced computational tools have led to a more thorough understanding of the neoplastic process as well as to the identification of potential biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. These high-throughput technologies accumulate scientific data on an unprecedented scale. However, these data are dispersed between several databases, including, *inter alia*, The Cancer Genome Atlas (TCGA) (1) Gene Expression Omnibus (GEO) (2), ONCOMINE (3), the Human Protein Atlas (4) and the Human Metabolome Database (HMDB) (5–7). This decentralized structure poses substantial problems when attempting to draw conclusions or formulate new hypotheses.

PubMed (8), a freely available database developed and maintained by the US National Library of Medicine, is one of the most important web-based search tools for biomedical information retrieval. Currently, PubMed has over 3 million citations on cancer. Thus, it is extremely difficult to manually retrieve all relevant data, even after splitting the subarea of interest or using specific queries. In addition, literature searches on cancer are hampered by the fact that cancer is a complex disease. Cancer and cancer subtypes more closely resemble a set of diseases, each disease with different features and unknowns. Head and neck (HN) cancer is the sixth most common type of cancer worldwide, with about 600 000 new cases in 2012 (9) and a remarkable example of heterogeneous malignancy.

Similar to what is observed in many types of neoplasms, the challenge in searching the literature on HN cancer is particularly difficult due to its diversity, which involves diversity in histological type, anatomical location and primary risk factors. For instance, the anatomical sites affected by the disease and the primary risk factors can be used to divide head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) into at least three classes. Two of these classes

involve human papillomavirus (HPV)-positive disease (mostly oropharyngeal with a favorable prognosis) and HPV-negative disease (with less favorable prognosis and a different molecular profile) (10). HPV-positive tumors are primarily wild-type TP53, whereas HPV-negative tumors present mutated TP53 and show high chromosome instability (10, 11), which may sustain advantageous metabolic pathways, aid in escaping the inhibitory effects of suppressor signals (12) or promote oncogenic effects (13). A third class of HNSCC consists of nasopharyngeal tumors in which distinct etiological factors are known, including Epstein–Barr virus (EBV) infection (14).

Lymph node status and tumor size remain the most powerful prognostic factors for HNSCC. However, survival is frequently low. Only 40–50% of patients remain alive 5 years after diagnosis (10, 15). This is likely because tumors in early stages frequently present few symptoms leading to a delay in diagnosis. Furthermore, therapy effectiveness is highly variable, even in early lesions or histologically similar cases.

The HNSCC molecular progression model suggests that some genetic alterations are present in benign hyperplasia, for instance the inactivation of the CDKN2A gene. According to this model, the clinical progression to dysplasia, *in situ* carcinoma, and, finally, invasive carcinoma is supported by the increased accumulation of molecular alterations (16). TP53 mutations, CCND1 gene amplification, EGFR activation/PTEN inactivation, and the deletion of different genome segments are some examples of the genetic alterations related to HNSCC progression, as stated by Leemans and collaborators (10). Such alterations promote the neoplastic phenotype defined by Hanahan and Weinberg (17), including increased cell proliferation, insensitivity to growth suppression factors, apoptosis resistance, sustained angiogenesis, energy metabolism alterations, immune attack avoidance and the acquisition of invasion and metastasis capability.

Investigations into HNSCC emphasize the importance of identifying the mechanisms and the molecular changes triggered during the malignant transformation that culminates in the neoplastic phenotype. New data on potential markers may shed light on tumor biology and, consequently, lead to the development of novel drugs. Literature mining is a fundamental starting point for this discovery process, but the recent exponential growth in biological data is well beyond the limit of a complete manual search in most cases. In turn, automated literature mining can help to find disease-related biomarkers and their interrelationships, and extract hidden information with tools able to efficiently target valuable research questions and generate testable hypothesis. During this process, the articles of interest are retrieved, the biological entities are identified in texts, and specific information, particularly relationships between biological entities, is extracted.

One of the challenges in automated approaches is the exact identification of genes, proteins or diseases since they may be referred to by different names, share names and symbols, or even be described by nonstandard nomenclature in literature and databases (18). Another challenge is to identify consistent descriptions of gene products and their associated features, and supporting evidence for inferring such associations. To overcome these limitations, text-mining applications have incorporated tools to recognize specific keywords and to capture relevant sentences and ontologies. For example, relationships may be extracted investigating entities that co-occur in the same report, title, abstract or even a sentence, or by the so-called natural language processing (NLP) methods. NLP methods are based on the structure of sentences and on how the biological data is mentioned (19). However, this approach has advantages and limitations, since it may give rise to erroneous relationships depending on used parameters (20).

The controlled vocabularies of the Gene Ontology (GO) (21) project enable coupling of gene products to their associated biological processes, cellular components and molecular functions (22). However, the automatic identification of GO-literature association is less accurate than manual curation methods, such as the one using Medical Subject Headings (MeSH) (23) for indexing PubMed articles, a process performed by trained experts that potentially generates few false positive assignments. In addition, MeSH-literature associations may be linked to genes or diseases, facilitating the identification of previously unrevealed relationships between entities, such as protein–protein, drug–effect and protein–disease (24, 25).

In this work, we developed an in-house methodology to conduct literature mining aiming to identify genes and gene products related with various aspects of HNSCC. A database (HNdB) was established for unifying the

information on these genes and proteins, covering data on genomics, transcriptomics, proteomics, literature citations, and also cross-references of external databases. The information was wrapped up in a friendly web interface, which provides easy and rapid access to the HNSCC-related genes and to a vast number of biological data resources. The interfaces aims to facilitate the selection of candidates for validation assays and the identification of potential new markers, as exemplified in this study.

Methods

Data collection and literature mining

The workflow of our literature mining consisted of two initial automated stages and a separate manual step. In stage I, the studies were retrieved from PubMed database using a combination of MeSH terms and Boolean operators. Three literature searches based on different MeSH terms were run on 29 June 2015. In stage II, the articles selected in stage I were associated with genes using the gene2pubmed association file (26), which contains the gene identifiers (gene IDs) and the respective PubMed article identifiers (PMIDs). For this association, only human genes were accepted. The PMIDs thereby obtained were downloaded via PubMed and compiled, and publications assigned to MeSH terms for HN neoplasms were manually curated by two independent investigators. The details on the MeSH terms and on the literature search strategy are presented in [Supplementary File 1](#) and an overview of the workflow is provided in [Figure 1](#).

Considering that our automated strategy may have missed relevant articles and genes, the only two databases, to our knowledge, that also focus on HNSCC were searched: the Head and Neck and Oral Cancer Database (HNOCDB) and Oral Cancer Gene Database (OrCGDB) (27, 28). PMIDs/genes not detected by our approach but selected by these databases were included in our list after manual curation to confirm a positive involvement with the HNSCC sites of interest. Precision (specificity) and recall (sensitivity) values were calculated, respectively, as the proportion of genes relevant from our search, and as the proportion of relevant genes that were retrieved [Precision = genes retrieved and relevant/total genes retrieved; Recall = genes retrieved and relevant/total genes relevant in collection]. To overcome the difficulty of predicting the total number of genes in PubMed that are relevant for our search, we used HNOCDB and OrCGDB data on the same query.

To establish a gene-to-HNSCC association, contingency tables were constructed using the curated set of articles addressing genes in HNSCC, and PMIDs and genes from all

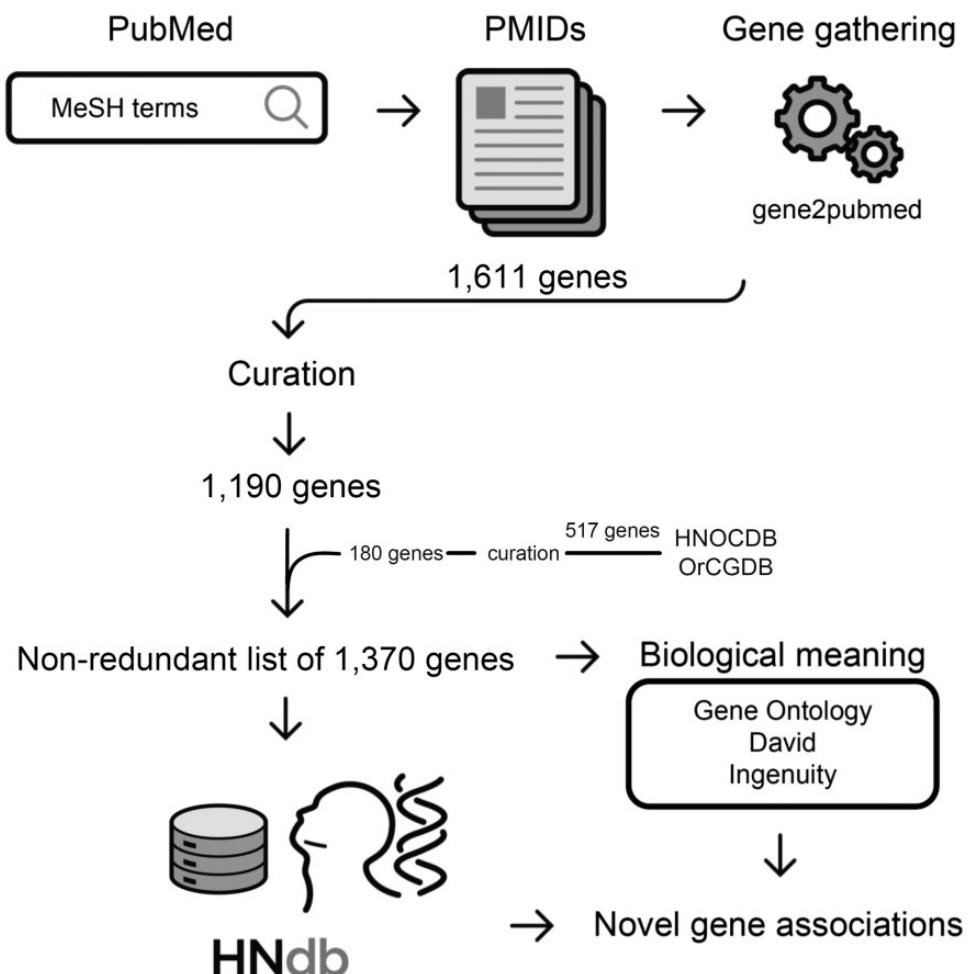


Figure 1. Flowchart of the method for gathering genes related to HNSCC. Identification of studies on HNSCC in PubMed using MeSH terms of interest, retrieval of PMIDs, gene-to-publication assignment via gene2pubmed association file, selection of genes in HNOCDDB and OrCGDB databases, manual curation to confirm a positive involvement of PMIDs in HNSCC subsites of interest, retrieval of a nonredundant list of 1370 genes related to HNSCC, access to biological meanings, identification of novel gene associations.

other neoplasms. Fisher's exact test was performed to evaluate association and $P < 0.05$ were considered statistically significant. The analyses were performed using SAS® 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for Windows. Genes were then ranked according to their level of association with HNSCC—from the most relevant to the less relevant defined by the number of publications addressing the gene in HNSCC—by a hypergeometric test (29) performed using the Stirling's approximation to high-factorial values (30). The method calculates the probability of k or query-relevant publications for a gene A by chance, being S the score for gene A, m the publications in the gene2pubmed association file, n the number of publications retrieved for the query and present in the gene2pubmed association file, j the number of publications that involve gene A, and k the number of query-relevant publications that involves the gene A. The formula ($\ln =$ natural logarithm) is:

$$S_A = \ln(f(m, n, j, k))$$

$$f(m, n, j, k) = \sum_{i=k}^{\min(n,j)} \frac{\binom{m-j}{n-i} \binom{j}{i}}{\binom{m}{n}}$$

Due to the importance of identifying prognostic signatures for HNSCC as well as markers associated with disease progression, an independent search was performed using MeSH and non-MeSH terms related to 'Metastasis' and 'Prognosis/Outcome' against abstracts and titles of the manually curated PMID set of articles (Supplementary File 1).

The data collection workflow will be routinely updated twice per year to incorporate new PMIDs and genes.

Database frameworks and web interface

To integrate potential biomarkers involved in HNSCC with data from the available literature, we constructed a MySQL relational database system implemented in an Apache server using the Linux operating system. The web platform interface was developed using the JavaScript programming language, HTML and PHP at the front end and the back end supported by PHP and PERL programming languages. The platform provides users with the ability to search for and download information on the genes and proteins involved in HN cancer.

The home page presents the database objectives and provide tools for searching genes related to HNSCC, their expression pattern and chromosome location. External data were included in the database to facilitate access to the maximum amount of information on a particular gene or protein. For example, the genes selected by users are linked to PMIDs, metabolic pathways (31, 32, 33, 34), associated ontologies (21), somatic mutations in HN cancer (35), genetic disorders (36) and microarray data. HNSCC microarray data were obtained from GEO (2) and ONCOMINE (3) platforms at the time of manuscript preparation (GEO accession numbers GSE9844, GSE6631, GSE1722, GSE13601, GSE3524, GSE2379, GSE25099 and ONCOMINE dataset Ginos Head-Neck) (37–44) and may help users identify genes with similar expression patterns. Data on proteins, including interactions and drugs that target them (4, 45–53) are also available.

GO and pathway analysis

The curated set of genes related to HNSCC was imported into DAVID (54, 55), a database for annotation, visualization and integrated discovery (54), and the genes were annotated for GO and pathways using the whole human genome as background. The one-tail Fisher Exact Probability Value was used for gene-enrichment analysis and Bonferroni corrected $P < 0.05$ were considered significant. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Qiagen, Redwood City, CA, USA) was also used to identify relevant canonical pathways overrepresented in the set of HNSCC-related genes.

Database querying

The database is freely available and can be searched at <http://www.gencapo.famerp.br/hndb/> with three input forms. By typing the gene symbol, aliases, gene or protein name, accession number or ID into the search box, users can obtain information on whether a gene has already been related to HN cancer. Users can also retrieve all genes

related to HN cancer at once and evaluate their expression in HN tumor samples and paired surgical margins, according to eight microarray studies (37–44) selected at the time of the manuscript preparation and described in the ‘Database frameworks and web interface’ section. The search settings are configured to use the official gene symbols, ID numbers and aliases from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) or Ensembl Project (56, 57), as well as proteins (by accession number) from the Universal Protein Resource (UniProt) (58).

Users can also browse chromosome regions associated with HN cancer. The data returned by the queries can be downloaded as a spreadsheet or a text file. The results of a particular gene are displayed in a new page that provides the official gene name, gene IDs, aliases, chromosome location and gene expression pattern generated via microarray studies on tumor tissues as well as articles that support its involvement in HNSCC or report prognostic markers. As indicated above, the results also include gene ontologies, metabolic pathways and links to external databases on expression patterns in normal tissues, somatic mutations in cancer and gene-phenotype or disease associations. The protein page provides 3D structures and posttranslational modifications, metabolite and protein–protein interactions, expression patterns and drugs for targets of interest.

Results and discussion

In total, the ‘Neoplasms by site’ search resulted in 1 819 931 articles (between 2015 and 1928). Two searches for ‘Head and Neck Neoplasms’ resulted in 38 862 and 41 086 articles (between 2015 and 1945), respectively, which after gene2pubmed association and exclusion of redundancy, generated a list of 1611 genes. Following a manual curation, 421 genes not related to HNSCC were excluded and a list of 1190 genes was obtained. To this list, 180 among 517 genes identified by HNOCDDB and OrCGDB databases but not detected by our approach were added after a thorough manual reevaluation, resulting in 1370 genes in total. Considering these data, the precision (specificity) of our automated approach was estimated in 74%, and recall (sensitivity) was estimated in 87%. Although these values are satisfactory, they still need to be improved since not all the genes retrieved by the approach were considered relevant after manual curation. In addition, several relevant genes were missed, which indicates that the literature search in future versions of HNdb have to be expanded to include articles identified through digital libraries besides PubMed (e.g. Google Scholar, Web of Science and Scopus) (59–61), and approaches for

information extraction should be added, such as NLP based methods.

The analysis of contingency tables constructed using our PMID sets revealed that, although HNSCCs compared to all neoplasms (except HNSCC) show genes with differential citation frequency at the 0.05 level of significance, none of these genes are exclusively associated with HNSCC. In fact, established HNSCC genes listed by (10) (*CCND1*, *CDKN2A*, *EGFR*, *MET*, *PIK3CA*, *PTEN*, *SMAD4*, *TP53*) are also associated with several other tumors (62–69) and all are present in our list of HNSCC-related genes. These results highlight the need of extensive basic and clinical research focused on unique characteristics of this group of carcinomas.

Table 1. Top HNSCC-related genes

Gene	N	Gene	N	Gene	N	Gene	N
TP53	122	NOTCH1	13	ALDH2	7	CD4	5
EGFR	101	VEGFC	13	ANXA2	7	CXCL12	5
CDKN2A	77	MTHFR	12	CASP8	7	CXCL14	5
GSTM1	58	RELA	12	CDK4	7	CYP2D6	5
GSTT1	48	TGFB1	12	CSTA	7	DAPK1	5
CCND1	43	XRCC3	12	CYP1B1	7	ERCC4	5
VEGFA	35	ADH1B	11	FOXM1	7	ERCC5	5
STAT3	34	MIR21	11	H3F3A	7	FASLG	5
MMP9	33	MKI67	11	HPSE	7	FGF2	5
GSTP1	32	TERT	11	ITGB1	7	FN1	5
CD44	31	ADH1C	10	MDM2	7	HGF	5
PTGS2	31	BMI1	10	TIMP3	7	HMGB1	5
XRCC1	31	MLH1	10	XIAP	7	IGF1R	5
BIRC5	28	MMP1	10	CASP3	6	IL10	5
HIF1A	28	PECAM1	10	CD82	6	IVL	5
TP63	28	RB1	10	CDK2	6	JAG1	5
CDH1	26	CDKN1B	9	CDK2AP1	6	KRT19	5
CYP1A1	24	CTTN	9	CXCL8	6	LGALS1	5
MMP2	21	HSP90AB1	9	CXCR4	6	MIR375	5
PTEN	20	MET	9	ENG	6	MTR	5
ERCC2	19	MMP3	9	EPHA2	6	NME1	5
ERCC1	18	SLC2A1	9	FHIT	6	NQO1	5
CDKN1A	17	SOX2	9	KRAS	6	PARK7	5
AKT1	16	TNF	9	KRT14	6	PCNA	5
BCL2	16	AURKA	8	LAMA5	6	PTK2	5
NFKB1	16	DNMT3B	8	MAPK1	6	RHOC	5
BSG	15	EPHX1	8	MSH2	6	SMAD4	5
CCR7	15	FAS	8	MTDH	6	SNAI1	5
ERBB2	15	ITGAV	8	PLAU	6	STAT1	5
HSPA1A	15	MGMT	8	PROM1	6	TGM3	5
OGG1	15	MTOR	8	RAD51	6	TIMP2	5
CYP2E1	14	MYC	8	S100A4	6	TLR4	5
PIK3CA	14	NOS2	8	SKP2	6	TYMS	5
TP73	14	RASSF1	8	SRC	6	VCAN	5
CTNNB1	13	S100A7	8	ABCB1	5	XPC	5
IL6	13	SPP1	8	CA9	5	XRCC5	5
NAT2	13	TWIST1	8	CAV1	5		

N = number of PMIDs per gene.

One hundred forty-eight of 1370 genes were linked to at least five PMIDs and thus were classified as top HNSCC-related genes, with *TP53* and *EGFR* being the first two genes of this list (Table 1). These scores for *TP53* and *EGFR* were confirmed by the hypergeometric test (Supplementary Table 1), and indicate that they represent the most extensively studied ones and certainly exhibit relevant results. Regarding the 893 genes mentioned by only one article, many of them probably have not yet been completely exploited as potential markers and deserve further investigations.

The 1370 HNSCC-related genes showed a heterogeneous distribution along the chromosomes (Table 2) and, as expected, many of them were mapped to known HNSCC ‘hot spots’ such as 11q13 (70, 71). However, several others were mapped to less frequently cited regions. Approximately 10% were mapped to chromosome 1, 7% to chromosome 11 and almost the same amount to chromosome 17, a distribution not correlated with the size in MB of each chromosome.

To evaluate the performance of our literature mining approach, we compared our nonredundant list of 1190 genes with the top genes selected in HNOcdb and OrCGDB (currently frozen) databases. Considering the same anatomical sites analyzed in the present work, HNOcdb extracted 133 genes in oral, 14 in tongue, 7 in hypopharyngeal, 3 in oropharyngeal and 60 in laryngeal cancers through text-mining. OrCGDB selected 374 genes involved in oral cancer by searching PubMed abstracts and MeSH terms. A total of 517 nonredundant genes was identified by these databases. After a manual curation, 180 genes retrieved from HNOcdb and OrCGDB were added to our list of 1190 genes. In contrast with these databases, the present study performed three searches using MeSH terms and was more stringent by excluding articles that also analyzed non-HNSCC tumors. Therefore, our gene list (the largest of the three databases) is more specific and, therefore, more focused on the tumors of interest. In addition, the IPA showed that the top canonical pathway associated with our 1190 genes is the Molecular Mechanisms of Cancer ($P = 6.64^{-66}$, overlap 34.5%, 126/365), thus supporting their relevance in the neoplastic process. Differently, this pathway was not associated with OrCGDB and HNOcdb genes ($n = 517$), which showed as the top-ranked pathways Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling ($P = 1.42E^{-32}$, overlap 29.3% 41/140), Bladder Cancer Signaling (p-value $4.44E^{-32}$, overlap 39.1% 34/87) and Hepatic Fibrosis/Hepatic Stellate Cell Activation ($P = 5.49E^{-32}$, overlap 24.6% 45/183). Furthermore, HNdb is the only database that uses specific MeSH terms to link genes to literature data on prognosis and outcome (Supplementary Table 2, also available on the gene results

Table 2. Distribution of HNSCC-related genes by chromosome band

Chr	N	%	Chr	N	%	Chr	N	%	Chr	N	%	Chr	N	%
1p12	2	0.15	3p21-p24	1	0.07	6q16	1	0.07	10p11	5	0.36	17p11	2	0.15
1p21-p13	17	1.19	3p22	4	0.29	6q21	4	0.29	10p13	3	0.22	17p12	1	0.07
1p22	3	0.22	3p24	3	0.22	6q22-q24	6	0.44	10p15-p14	5	0.36	17p13	14	0.98
1p32-p31	8	0.58	3p25	7	0.51	6q25	5	0.36	10q11	5	0.36	17q	1	0.07
1p36-p34	38	2.66	3p26	2	0.15	6q26	2	0.15	10q21	4	0.29	17q11	13	0.91
1q21	23	1.61	3q12-q13	7	0.51	7p11	2	0.15	10q22	5	0.36	17q12	5	0.36
1q21-q22	1	0.07	3q21	3	0.22	7p12	3	0.22	10q23-26	36	2.52	17q12-q21	1	0.07
1q21-q25	1	0.07	3q22	1	0.07	7p13	1	0.07	11p12-p11	4	0.29	17q21	25	1.75
1q22-q23	4	0.29	3q23	1	0.07	7p14	3	0.22	11p13	3	0.22	17q21-q22	2	0.15
1q23	9	0.66	3q25-q27	9	0.66	7p15-p13	5	0.36	11p15-p14	31	2.17	17q22	2	0.15
1q24	1	0.07	3q27	4	0.29	7p21	5	0.36	11q11	1	0.07	17q22-q23	1	0.07
1q25	5	0.36	3q28-q29	4	0.29	7p22	6	0.44	11q12	4	0.29	17q23	5	0.36
1q25-q31	2	0.15	4p14-p13	1	0.07	7q11	5	0.36	11q13	30	2.1	17q23-q25	1	0.07
1q31-q32	6	0.44	4p15	1	0.07	7q21	8	0.58	11q14-q21	5	0.36	17q24	5	0.36
1q32	12	0.88	4p16	2	0.15	7q21-q22	3	0.22	11q22-q23	23	1.61	17q25	13	0.91
1q32-q41	1	0.07	4q11-q12	1	0.07	7q22	9	0.66	11q24	2	0.15	18p11	3	0.22
1q41-q42	11	0.77	4q12	4	0.29	7q31	9	0.66	12p13-p12	27	1.89	18q11	3	0.22
1q43	1	0.07	4q12-q13	1	0.07	7q32	5	0.36	12q11-q13	23	1.61	18q12	3	0.22
1q43-1q23	1	0.07	4q13	9	0.66	7q32-q34	1	0.07	12q14-q15	9	0.66	18q21	15	1.09
1q44	2	0.15	4q13-q21	1	0.07	7q34	3	0.22	12q21	5	0.36	18q22	1	0.07
2p12	3	0.22	4q21	7	0.51	7q34-q35	1	0.07	12q22	1	0.07	18q23	1	0.07
2p12-p11	1	0.07	4q22	3	0.22	7q35-q36	1	0.07	12q23	1	0.07	19p12	1	0.07
2p13	3	0.22	4q23-q25	10	0.70	7q36	3	0.22	12q24	15	1.09	19p13	24	1.68
2p13-p12	1	0.07	4q26	2	0.15	8p12-p11	6	0.44	13q11-q13	8	0.58	19q12	1	0.07
2p14	1	0.07	4q27	2	0.15	8p21	8	0.58	13q14	5	0.36	19q13	39	2.73
2p21	3	0.22	4q28	1	0.07	8p21-p12	1	0.07	13q21	1	0.07	20p12-p11	3	0.22
2p21-p16	1	0.07	4q31	6	0.44	8p22	6	0.44	13q22	3	0.22	20p13	3	0.22
2p22	3	0.22	4q32	2	0.15	8p22-p21	1	0.07	13q31	1	0.07	20pter-p12	1	0.07
2p24	2	0.15	4q34-q35	6	0.44	8p23	8	0.58	13q33-q34	4	0.29	20q11	8	0.58
2p25	2	0.15	5p13	5	0.36	8q11	4	0.29	14q11-q12	9	0.66	20q12-q13	8	0.58
2q11	2	0.15	5p15	5	0.36	8q12	1	0.07	14q13	3	0.22	20q13	12	0.88
2q12	1	0.07	5q11	2	0.15	8q13	3	0.22	14q22-q23	6	0.44	21q21	2	0.15
2q13	1	0.07	5q12-q13	2	0.15	8q21	5	0.36	14q24	5	0.36	21q22	9	0.66
2q14	2	0.15	5q13	2	0.15	8q22	4	0.29	14q31-q32	20	1.4	22q11	8	0.58
2q21	3	0.22	5q14	4	0.29	8q22-q23	1	0.07	15q11	1	0.07	22q12	3	0.22
2q22	1	0.07	5q21-q22	1	0.07	8q23	5	0.36	15q12	1	0.07	22q13	18	1.26
2q23-q24	3	0.22	5q23	2	0.15	8q24	16	1.12	15q13	2	0.15	Xp11	5	0.36
2q31	3	0.22	5q31	12	0.88	9p12	1	0.07	15q14	3	0.22	Xp21	3	0.22
2q31-q32	1	0.07	5q31-q32	1	0.07	9p13	4	0.29	15q15-q21	5	0.36	Xp22	7	0.51
2q32	2	0.15	5q32	5	0.36	9p21	5	0.36	15q22	7	0.51	Xp22-p21	1	0.07
2q33	4	0.29	5q33	2	0.15	9p22	3	0.22	15q23-q24	9	0.66	Xq11	1	0.07
2q33-q34	3	0.22	5q34	3	0.22	9p23-p24	1	0.07	15q25-q26	7	0.51	Xq12	2	0.15
2q34	2	0.15	5q35	8	0.58	9p24	3	0.22	16p11	3	0.22	Xq13	1	0.07
2q35	9	0.66	6p12	6	0.44	9q21	6	0.44	16p12	4	0.29	Xq21-q22	4	0.29
2q35-q37	1	0.07	6p21	28	1.96	9q22	8	0.58	16p13	12	0.88	Xq23	1	0.07
2q36	2	0.15	6p22	2	0.15	9q31	5	0.36	16q12	1	0.07	Xq25	1	0.07
2q37	16	1.12	6p23	1	0.07	9q32	2	0.15	16q13	4	0.29	Xq26	5	0.36
3p11	1	0.07	6p24	4	0.29	9q32-q33.3	2	0.15	16q21-q22	12	0.88	Xq28	9	0.66
3p14	2	0.15	6p25	2	0.15	9q33	7	0.51	16q23	1	0.07	ND	4	0.29
3p21	17	1.19	6q14	2	0.15	9q34	15	1.09	16q24	4	0.29			

Chr = chromosome band; N (%) = number of genes and percentage; ND = not determined.

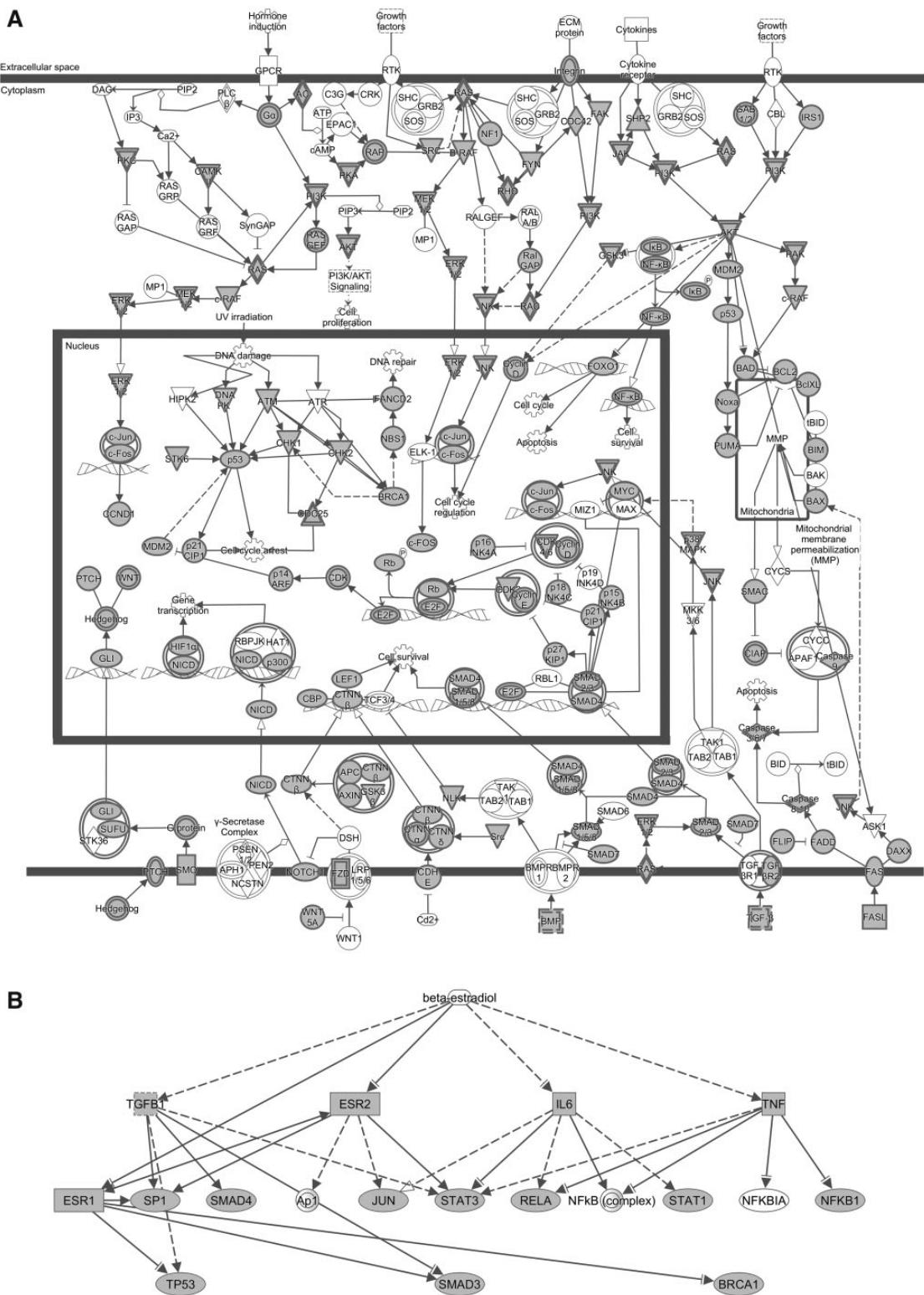


Figure 2. Biological networks according to IPA of 1370 genes related to HNSCC. (A) The canonical pathway ‘Molecular mechanisms of cancer’ and the growing picture of molecular mechanisms in HNSCC: receptor signaling pathways are induced by hormone, growth factors, extracellular matrix proteins or cytokines, leading to the activation of different cytoplasmatic effectors and transcription factors, and promoting cell cycle regulation, DNA repair, apoptosis, and cell survival and proliferation. (B) Beta-estradiol as an upstream regulator in head and neck tumorigenesis: network enriched in transcription factors/regulators (*ESR1* and 2, *JUN*, *TP53*, *NFKB1*, *RELA*, *STAT1* and 3, *SP1*), signal transducers (*SMAD3* and 4), DNA repair protein (*BRCA1*) and proinflammatory cytokines (*IL6*, *TGFB1*, *TNF*) identified by the present study. Solid arrows = known interactions; dotted arrows = indirect interactions; inverted triangle = kinase; double circle = complex; circle, ellipse, diamond or square = other; filled shapes = genes from our list; nonfilled shapes = genes that are part of the network but not part of the list.

page), facilitating the identification of markers that are relevant to tumor biology and therapy response.

To investigate the biological meaning of the HNSCC-related genes, we performed a GO and pathway analyses using DAVID tools. A total of 1329 DAVID identifiers were mapped from the list of 1370 genes and similar annotation terms were clustered into groups, removing redundancy. More than 500 of annotation clusters were obtained, 86 of them with enrichment scores >5.0 and Bonferroni corrected $P < 0.05$ (Supplementary Table 3). The results showed an overrepresentation of clusters related to tissue development and differentiation, response to stimulus, signal transduction, cell proliferation, cell migration, apoptosis, transcription and cell adhesion, which are biological processes relevant to cancer. In addition, the top five canonical pathways identified by the IPA for these 1370 genes were Molecular Mechanisms of Cancer (Figure 2A), Colorectal Cancer Metastasis Signaling, Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis, Pancreatic Adenocarcinoma Signaling and IL-8 Signaling ($P = 4.90E^{-71}$, $1.95E^{-58}$, $7.11E^{-56}$, $5.46E^{-53}$, $2.25E^{-48}$, respectively), thus strongly validating our strategy and the informative characteristic of the set of genes.

Furthermore, the diversity of results compiled in our dataset allowed identifying novel and mostly unexplored gene associations. For example, the DAVID analysis revealed that processes related to response to steroid hormone stimulus were significantly enriched in our list of genes (enrichment scores = 37.99, Bonferroni correction, $P_{corr} = 7.50E^{-31}$) and IPA showed beta-estradiol as one of the top upstream regulators (P -value of overlap = $3.35E^{-163}$), ranking next to *TGFB1*, *TNF* and *TP53* (Figure 2B). Few studies have explored the metabolic pathways involved in the response to steroid stimulus in HNSCC. Egloff and collaborators (72) observed that estrogen induces activation of members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in HNSCC cell lines. The authors also reported evidence that estrogen receptor and epidermal growth factor receptor cross talk is present in HNSCC. In turn, Brooks and collaborators (73) found that increased levels of estrogen receptor β promotes *NOTCH1* expression and differentiation of HNSCC cells both *in vitro* and *in vivo*. Thus, we demonstrate that a database integrating multiple types of data greatly expands the possibilities for gene networks investigation, providing potential associations to be tested.

Conclusions

Despite the development of tools to mine vast amounts of genomic data, to our knowledge, there is no initiative to curate and compile information from literature regarding

genes, proteins, metabolic pathways, diseases, prognosis/outcomes and drugs associated with HNSCC. The HNdb is an effort toward this goal and is intended to be an integrated database with rapid and easy-to-use tools that facilitate literature and biological data mining to thereby promote research and generate new insight into the development of useful markers for HN cancer.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Database* Online.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP and Conselho Nacional de Pesquisas/CNPq for financial support and fellowships. They are also grateful to Mauro Golin for artwork preparation and to GENCAPO (Head and Neck Genome Project—<http://www.gencapo.famerp.br/>) team for the valuable discussions that motivated the present study.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (FAPESP grant number 10/51168-0); and Conselho Nacional de Pesquisas/CNPq (CNPq grant number 306216/2010-8 CNPq grant numbers 306216/2010-8 and 474596/2013-3).

Conflict of interest. None declared.

References

- TCGA (2015) <http://cancergenome.nih.gov/> Vol. 2015. (18 December 2015, date last accessed).
- Edgar,R., Domrachev,M. and Lash,A.E. (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.*, 30, 207–210.
- Rhodes,D.R., Yu,J., Shanker,K. et al. (2004) ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*, 6, 1–6.
- Uhlen,M., Bjorling,E., Agaton,C. et al. (2005) A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 1920–1932.
- Wishart,D.S., Tzur,D., Knox,C. et al. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.*, 35, D521–D526.
- Wishart,D.S., Knox,C., Guo,A.C. et al. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.*, 37, D603–D610.
- Wishart,D.S., Jewison,T., Guo,A.C. et al. (2013) HMDB 3.0—the Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 41, D801–D807.
- NCBI (2015) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> Vol. 2015. (18 December 2015, date last accessed).
- IARC (2015) <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (18 December 2015, date last accessed).

10. Leemans,C.R., Braakhuis,B.J. and Brakenhoff,R.H. (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 11, 9–22.
11. Jin,C., Jin,Y., Wennerberg,J. *et al.* (2006) Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 164, 44–53.
12. Wang,D., Song,H., Evans,J.A. *et al.* (1997) Mutation and down-regulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, 18, 2285–2290.
13. Chung,C.H., Parker,J.S., Karaca,G. *et al.* (2004) Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*, 5, 489–500.
14. Jia,W.H. and Qin,H.D. (2012) Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. *Semin. Cancer Biol.*, 22, 117–126.
15. Siegel,R., Ward,E., Brawley,O. *et al.* (2011) Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J. Clin.*, 61, 212–236.
16. Califano,J., van der Riet,P., Westra,W. *et al.* (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.*, 56, 2488–2492.
17. Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646–674.
18. Morgan,A.A., Lu,Z., Wang,X. *et al.* (2008) Overview of BioCreative II gene normalization. *Genome Biol.*, 9(Suppl 2), S3.
19. Fleuren,W.W. and Alkema,W. (2015) Application of text mining in the biomedical domain. *Methods*, 74, 97–106.
20. Jensen,L.J., Saric,J. and Bork,P. (2006) Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. *Nat. Rev. Genet.*, 7, 119–129.
21. Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A. *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, 25, 25–29.
22. Mao,Y., Van Auken,K., Li,D. *et al.* (2014) Overview of the gene ontology task at BioCreative IV. *Database*, 2014. Database, 2014, 1–14.
23. NCBI (2015) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> Vol. 2015. (18 December 2015, date last accessed).
24. Xiang,Z., Qin,T., Qin,Z.S. *et al.* (2013) A genome-wide MeSH-based literature mining system predicts implicit gene-to-gene relationships and networks. *BMC Syst. Biol.*, 7(Suppl 3), S9.
25. Zhang,Y., Sarkar,I.N. and Chen,E.S. (2014) PubMedMiner: mining and visualizing MeSH-based associations in PubMed. *AMIA Annu. Symp. Proc.*, 2014, 1990–1999.
26. NCBI (2015) <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/gene/DATA/gene2pubmed.gz> (18 December 2015, date last accessed).
27. Mitra,S., Das,S., Ghosal,S. *et al.* (2012) HNOCDDB: a comprehensive database of genes and miRNAs relevant to head and neck and oral cancer. *Oral Oncol.*, 48, 117–119.
28. Gadewal,N.S. and Zingde,S.M. (2011) Database and interaction network of genes involved in oral cancer: Version II. *Bioinformation*, 6, 169–170.
29. Jourquin,J., Duncan,D., Shi,Z. *et al.* (2012) GLAD4U: deriving and prioritizing gene lists from PubMed literature. *BMC Genomics*, 13(Suppl 8), S20.
30. Mermin,N. (1984) Stirling's formula!. *Am. J. Phys.*, 52, 362–365.
31. Kanehisa,M. and Goto,S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28, 27–30.
32. Project., R. (2015) Reactome.
33. Croft,D., Mundo,A.F., Haw,R.. *et al.* (2014) The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research*, 42, D472–477.
34. Milacic,M., Haw,R., Rothfels,K.. *et al.* (2012) Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome. *Cancers*, 4, 1180–1211.
35. Forbes,S.A., Bhamra,G., Bamford,S. *et al.* (2008) The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, Chapter 10, Unit 10.11.
36. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, JHU (2015) Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (18 December 2015, date last accessed).
37. Ye,H., Yu,T., Temam,S. *et al.* (2008) Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics*, 9, 69.
38. Kuriakose,M.A., Chen,W.T., He,Z.M. *et al.* (2004) Selection and validation of differentially expressed genes in head and neck cancer. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 1372–1383.
39. Schlingemann,J., Habtemichael,N., Ittrich,C. *et al.* (2005) Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles. *Lab. Invest.*, 85, 1024–1039.
40. Estilo,C.L., O-charoenrat,P., Talbot,S. *et al.* (2009) Oral tongue cancer gene expression profiling: identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer*, 9, 11.
41. Toruner,G.A., Ulger,C., Alkan,M. *et al.* (2004) Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 154, 27–35.
42. Cromer,A., Carles,A., Millon,R. *et al.* (2004) Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene*, 23, 2484–2498.
43. Peng,C.H., Liao,C.T., Peng,S.C. *et al.* (2011) A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 6, e23452.
44. Ginos,M.A., Page,G.P., Michalowicz,B.S. *et al.* (2004) Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.*, 64, 55–63.
45. Kapushesky,M., Adamusiak,T., Burdett,T. *et al.* (2012) Gene Expression Atlas update—a value-added database of microarray and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res.*, 40, D1077–D1081.
46. Petryszak,R., Burdett,T., Fiorelli,B. *et al.* (2014) Expression Atlas update—a database of gene and transcript expression from microarray- and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res.*, 42, D926–D932.
47. Berman,H.M., Westbrook,J., Feng,Z. *et al.* (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28, 235–242.
48. Prasad,T.S., Kandasamy,K. and Pandey,A. (2009) Human Protein Reference Database and Human Proteinpedia as discovery tools for systems biology. *Methods Mol. Biol.*, 577, 67–79.
49. Jensen,L.J., Kuhn,M., Stark,M. *et al.* (2009) STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.*, 37, D412–D416.

50. Wishart,D.S., Knox,C., Guo,A.C. *et al.* (2008) DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.*, 36, D901–D906.
51. Wishart,D.S., Knox,C., Guo,A.C. *et al.* (2006) DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.*, 34, D668–D672.
52. Law,V., Knox,C., Djoumbou,Y. *et al.* (2014) DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.*, 42, D1091–D1097.
53. Knox,C., Law,V., Jewison,T. *et al.* (2011) DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res.*, 39, D1035–D1041.
54. Huang da,W., Sherman,B.T. and Lempicki,R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, 4, 44–57.
55. Huang da,W., Sherman,B.T. and Lempicki,R.A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, 37, 1–13.
56. NCBI Entrez gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (18 December 2015, date last accessed).
57. Ensembl (2015) <http://www.ensembl.org/> (18 December 2015, date last accessed).
58. UniProt Consortium. (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.*, 43, D204–D212.
59. Google Scholar, (2015) scholar.google.com. Vol. 2015. (18 December 2015, date last accessed).
60. Web of Science, W.o. (2015) webofknowledge.com. (18 December 2015, date last accessed).
61. Scopus (2015) www.scopus.com. (18 December 2015, date last accessed).
62. Musgrove,E.A., Caldon,C.E., Barraclough,J. *et al.* (2011) Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 11, 558–572.
63. Witkiewicz,A.K., Knudsen,K.E., Dicker,A.P. *et al.* (2011) The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle*, 10, 2497–2503.
64. Sharma,S.V., Bell,D.W., Settleman,J. *et al.* (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7, 169–181.
65. Gherardi,E., Birchmeier,W., Birchmeier,C. *et al.* (2012) Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 89–103.
66. Bader,A.G., Kang,S., Zhao,L. *et al.* (2005) Oncogenic PI3K de-regulates transcription and translation. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 921–929.
67. Hollander,M.C., Blumenthal,G.M. and Dennis,P.A. (2011) PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat. Rev. Cancer*, 11, 289–301.
68. Kin,C., Kidess,E., Poultides,G.A. *et al.* (2013) Colorectal cancer diagnostics: biomarkers, cell-free DNA, circulating tumor cells and defining heterogeneous populations by single-cell analysis. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 13, 581–599.
69. Robles,A.I. and Harris,C.C. (2010) Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a001016.
70. Wreesmann,V.B., Shi,W., Thaler,H.T. *et al.* (2004) Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.*, 22, 3965–3972.
71. Göllin,S.M. (2014) Cytogenetic alterations and their molecular genetic correlates in head and neck squamous cell carcinoma: a next generation window to the biology of disease. *Gene Chromosome Canc.*, 53, 972–990.
72. Egloff,A.M., Rothstein,M.E., Seethala,R. *et al.* (2009) Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 15, 6529–6540.
73. Brooks,Y.S., Ostano,P., Jo,S.H. *et al.* (2014) Multifactorial ERbeta and NOTCH1 control of squamous differentiation and cancer. *J. Clin. Invest.*, 124, 2260–2276.