FERNANDA CARREGARO

**Estudo das proteínas pequenas ricas em prolina
(SPRRs) em câncer de cabeça e pescoço**

*Study of Small Proline Rich Proteins (SPRRs) in Head and
Neck Cancer.*

**São Paulo
2012**

FERNANDA CARREGARO

**Estudo das proteínas pequenas ricas em prolina (SPRRs) em
câncer de cabeça e pescoço**

Study of Small Proline Rich Proteins (SPRRs) in Head and Neck Cancer.

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): Profa. Dra. Eloiza Helena
Tajara da Silva

São Paulo
2012

Carregaro, Fernanda
Estudo das proteínas pequenas ricas em prolina
(SPRRs) em câncer de cabeça e pescoço
92 páginas

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

1. SPRR 2. SPR 3. Câncer de Cabeça
e pescoço

Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Eloiza Helena Tajara da Silva

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão,

Agradeço o companheirismo, a dedicação e o apoio que me deram nessa fase importante da minha vida. Pois com vocês aprendi ter caráter e determinação para seguir em frente e construir um futuro digno.

Ao meu marido Albert,

Por ter me apoiado em todos os momentos com seu carinho e compreensão.

Por ter me aguentado nos momentos de alegria, tristeza, nervosismo e muiiito stress! Te amo!

Obrigado por fazerem parte da minha vida!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva,

Agradeço pelo esforço e compreensão, e por me ensinar o caminho da pesquisa.

Com você aprendi muito, e suas lições e direcionamentos puderam me ajudar a crescer no lado profissional.

Obrigada!!

AGRADECIMENTOS

Aos prof. Dr. Sandro Valentini e Prof. Cleslei Zanelli pela colaboração e por permitir a utilização de seu laboratório e infra-estrutura para realização de alguns experimentos.

Ao prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela colaboração, conversas e discussões sobre alguns experimentos. Suas idéias colaboraram muito para o meu trabalho!

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino e a Dra. Lays Martin Sobral pela colaboração e ajuda nos experimentos de invasão e migração.

Aos Prof. Dr. Thomas Carey, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti e à Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor, por doarem alíquotas das linhagens celulares para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferrari, pela colaboração para a realização da Análise Estatística.

À Profa. Dra. Ana Maria Razaboni pela orientação no estágio PAE.

Ao GENCAPO, por fornecer as amostras de pacientes para o presente estudo.

Aos coordenadores e funcionários do programa de pós-graduação do Instituto de Biosciências da USP. Em especial, a funcionária Deisy que sempre foi atenciosa e prestativa, muito obrigada!!

Ao apoio financeiro do CNPq e FAPESP.

Aos meus amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares (Alessandra, Flávia, Bianca, Carol, Tiago, Giovana e Larissa) pelo apoio e companheirismo durante essa etapa.

A presença de uma grande amiga, que me apoiou e me ajudou nas horas em que mais precisei em Ribeirão Preto, Gislane Vilela.

À minha amiga e pesquisadora Dra. Ana Carolina Viegas Carmo, que me apoiou e me ajudou no fim do meu trabalho!! Muito obrigada!!

Às minhas amigas de longa data, de São José do Rio Preto, por me apoiarem durante as horas de nervosismo e estresse, e por me escutarem quando eu mais precisava!!! Obrigada por vocês me apoiarem em mais uma etapa!

À toda minha Família, tios, tias, primas, e principalmente aos meus avós, que sempre me apoiaram em toda essa jornada! Muito Obrigada! Amo todos vocês!!!

A Deus, esta força misteriosa que nos rodeia e sempre esteve presente ao longo desta fase de minha vida. Obrigada por ter me presenteado com pessoas e experiências fundamentais para o meu crescimento.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
Aspectos básicos dos tecidos epiteliais normais	2
O processo de diferenciação das células epiteliais	3
As proteínas pequenas ricas em prolina (SPRs)	9
Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço	19
II. OBJETIVOS	22
III. MATERIAL E MÉTODOS	24
Casuística	25
Análise filogenética	29
Cultura de Células	30
Indução da expressão gênica	31
Avaliação de morfologia, índice de proliferação celular, migração e invasão	34
Tratamento da linhagem celular Hep-2 com Anexina	35
Extração de RNA e obtenção do cDNA	36
PCR em tempo real	37
Clonagem	38
Sequenciamento de DNA	42
Análise Estatística	44
IV. RESULTADOS	45
Casuística	46
Análise filogenética dos genes <i>SPRRs</i>	46
Integridade do RNA de linhagens celulares e tumores primários	49
Curvas-Padrão	50
Expressão dos genes <i>SPRRs</i> em linhagens celulares	51
Expressão dos genes <i>SPRRs</i> em tumores primários	51
Indução da expressão gênica	56
Índice de proliferação	56
Ensaio de migração e invasão	59
Tratamento da linhagem celular Hep-2 com Anexina	62
Clonagem dos genes <i>SPRR4</i> e <i>SPRR2E</i>	62

V. DISCUSSÃO	67
VI- CONCLUSÕES	77
VII- RESUMO	79
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
IX. ANEXO	91

Aspectos básicos dos tecidos epiteliais normais

Os tecidos de vertebrados são didaticamente divididos em dois grandes grupos: os epiteliais, geralmente com pouca substância intercelular, e os mesenquimais que, ao contrário, são mais ricos em material extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os tecidos epiteliais são formados por células cubóides ou colunares ligadas entre si por meio de estruturas de adesão. Suas características morfológicas, como forma das células e estratificação, variam com a função que desempenham e compreendem a base da classificação desses tecidos. Em geral são agrupados em epitélio simples e estratificado e em um tipo intermediário denominado transicional. O primeiro deles apresenta uma camada de células em contato com a membrana basal e pode exibir um aspecto pseudoestratificado quando os núcleos se encontram em níveis variáveis. No estratificado, somente as células das camadas inferiores estão ligadas à membrana basal e são mitoticamente ativas, enquanto as do estrato intermediário sofrem processos de diferenciação. Quando queratinizadas (queratinócitos), as células do estrato superficial podem morrer se também corneificadas pela adição de uma camada proteinácea na superfície citoplasmática da membrana celular (revisto por Bragulla & Homberger, 2009). Um resumo da classificação dos epitélios e exemplos de localização no organismo são apresentados na Figura 1.

O citoesqueleto das células epiteliais é formado pela interação de microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários. Os microfilamentos são formados por moléculas de actina globular (G-actina) reunidas em actina filamentosa (F-actina) e se ancoram à membrana celular por proteínas como as plectinas. Os microtúbulos resultam da associação de moléculas de α - e β -tubulina e compreendem as maiores estruturas filamentosas do citoesqueleto. Os filamentos intermediários, ao contrário dos anteriores, não são polarizados e agregam-se em feixes de diâmetro variável que servem de arcabouço para os demais componentes do citoesqueleto, mas também são fundamentais para traduzir estímulos do ambiente em mudanças de expressão gênica. Nas células epiteliais, os filamentos intermediários são formados por queratinas encontradas apenas em vertebrados (revisto por Bragulla & Homberger, 2009).

Os epitélios revestem superfícies internas e externas do organismo, formam glândulas, separam compartimentos, regulam a troca de moléculas e atuam como órgãos sensoriais. Um dos melhores exemplos é a epiderme, um epitélio estratificado queratinizado corneificado que, juntamente com seus apêndices (penas e escamas em aves e répteis, pelos e unhas em mamíferos), teve um papel importante na colonização do ambiente terrestre durante a evolução. Esse tecido se especializou em defender o organismo de insultos externos, incluindo danos físicos (injúria mecânica, radiação ultravioleta/UV), químicos (substâncias irritantes, alergênicas, espécies reativas de oxigênio/ROS), infecção por microorganismos (bactéria, fungo e vírus), perda de água e calor (Proksch, 2008). Essa proteção é dada particularmente para as camadas celulares suprabasais por diferentes enzimas destoxicantes e de reparo bem como por proteínas e vitaminas antioxidantes, reduzindo os riscos de carcinogênese (Schafer & Werner, 2011).

Diferentemente da epiderme, outros tecidos epiteliais estratificados são não-queratinizados e revestem superfícies internas do organismo, incluindo parte da cavidade oral, esôfago e trato anogenital, que não estão submetidas ao mesmo grau de trauma mecânico que a pele. Os epitélios simples não estratificados, por outro lado, se especializaram em funções de absorção ou secretórias e revestem órgãos como o intestino, o fígado e o rim (revisto por Presland & Dale, 2000; Presland & Jurevic, 2002; McLean, Irvine, 2007).

Muito do conhecimento atual sobre a organização e as funções dos tecidos epiteliais deriva de estudos de doenças hereditárias ou fortemente associadas a fatores ambientais. Com a utilização de ferramentas de Biologia Molecular tem sido possível estudar animais modelo e investigar a estrutura de proteínas produzidas por esses tecidos e entender sua estrutura e funcionamento.

O processo de diferenciação das células epiteliais

A diferenciação celular no epitélio tem início com a migração de células da membrana basal para as camadas superiores. Em sequência, ocorre perda de atividade mitótica,

diferenciação e morte celular, cada fase caracterizada pela presença de proteínas específicas (Candi et al., 2005). Embora a proliferação seja característica das camadas mais basais, onde as células pluripotentes devem residir, figuras mitóticas podem também ser detectadas em camadas mais superficiais durante processos de cicatrização, neoplásicos e inflamatórios (Alberts et al., 2002).

Nos epitélios estratificados queratinizados, como a epiderme e a mucosa da gengiva e do palato duro, as células seguem um programa de diferenciação que resulta na formação de uma superfície mecanicamente resistente, composta de células mortas corneificadas, sem núcleo e sem organelas citoplasmáticas, preenchidas por filamentos de queratina (revisto por Presland & Dale, 2000; Presland & Jurevic, 2002).

As queratinas são as proteínas predominantes do citoesqueleto em todos os epitélios. Pertencem à superfamília de filamentos intermediários e são classificadas em tipo I (ácidas) e II (básicas) de acordo com suas propriedades bioquímicas e seqüência de aminoácidos. São resistentes à digestão pelas proteases tripsina e pepsina e são insolúveis em ácidos diluídos, álcalis, água e solventes orgânicos, mas solúveis em uréia (Steinert et al., 1982; Steinert et al., 1985). Reúnem-se aos pares para compor filamentos que se estendem do núcleo até a membrana, formando estruturas para suportar o estresse e manter o formato e a viabilidade das células (Steinert, 2001).

Os filamentos de queratina são ancorados a complexos de adesão no lado interno da membrana celular, tais como os desmossomos, assegurando que os queratinócitos permaneçam conectados e que ocorra transferência de forças mecânicas entre células vizinhas (Hanakawa et al., 2002). Os desmossomos são formados por dois grupos principais de proteínas: as proteínas de adesão transmembrânicas da família das caderinas (desmogleínas e desmocolinas) e as proteínas citoplasmáticas de ancoragem (como placoglobina, desmoplaquina, placofilina, envoplaquina e periplaquina) (Alberts et al., 2002; Presland & Jurevic, 2002).

Os tecidos epiteliais expressam diferentes pares de queratina dependendo do tipo de célula e do estágio de diferenciação. A maioria dos epitélios estratificados expressa o par de

queratinas 5 e 14 (K5/K14) na camada basal proliferativa. As camadas suprabasais, normalmente pós-mitóticas e em processo de diferenciação, expressam outros pares de queratinas. Por exemplo, na epiderme, são expressas as queratinas K1 e K10 enquanto, na mucosa oral, são expressas K4 e K13 (Figura 2) (Bragulla, Homberger, 2009; Presland; Jurevic, 2002).

Em paralelo à síntese de queratinas específicas, as células epiteliais produzem outras proteínas bem como lipídeos. Em estágios avançados da diferenciação, as células adquirem grânulos querato-hialinos com profilagrina, o precursor da filagrina, que é responsável pela agregação de filamentos de queratina em pacotes densos. Essa agregação promove o colapso da célula em uma forma achatada característica das camadas superficiais e inicia o processo de corneificação (Candi et al., 2005), com síntese de uma série de proteínas. Entre elas, estão a loricrina (a mais abundante), a involucrina, as proteínas pequenas ricas em prolina (*small proline-rich protein* / SPRs) e as LEPs (*late envelope proteins*) (Kalinin et al., 2001; Marshall et al., 2001). Essas proteínas unem-se por ligações dissulfeto e isopeptídicas, catalisadas por transglutaminases dependentes de cálcio (Steinert; Marckov, 1995), resultando em um envelope protéico insolúvel, ideal para a função protetora dos tecidos subjacentes (Martinet et al., 1990). Pelo menos na epiderme, esse processo parece depender da ativação de Notch, uma família de proteínas transmembrânicas que atuam na sinalização celular e podem induzir ativar genes do programa de diferenciação (Okuyama et al. 2008).

A Figura 3 mostra as camadas celulares do epitélio queratinizado durante a diferenciação e suas proteínas.

Figura 1: Classificação dos epitélios em simples, transicional e estratificado corneificado e queratinizado, e exemplos de cada classe (modificado de Presland; Jurevic, 2002; Bragulla, Homberger, 2009, Candi et al., 2005).

Figura 2: Estrutura de epitélio estratificado (A) queratinizado da epiderme e de alguns sub-sítios da cavidade bucal e (B) não-queratinizado da mucosa oral, indicando os tipos de queratinas (K) e as queratinopatias associadas aos genes dessas queratinas. IBS, ictiosa bolhosa de Siemens; EHK, hiperqueratose epidermolítica; PC-1, paquioníquia congênita tipo I; EB simplex, epidermólise bolhosa simplex (modificado de Presland; Jurevic, 2002).

Figura 3: Camadas celulares do tecido epitelial queratinizado durante o processo de diferenciação e proteínas presentes em cada uma delas (modificado de Candi et al., 2005). K=queratina; TG=transglutaminase; SPR= proteínas pequenas ricas em prolina

O processo de formação do envelope corneificado da epiderme foi resumido por Kalinin et al. (2001) em três etapas principais (Figura 4). Na primeira etapa, a periplaquina e a envoplaquina, juntamente com a involucrina, associam-se com a membrana plasmática em uma maneira dependente de cálcio. Nesse momento, a transglutaminase 1 é expressa e liga-se à membrana onde promove ligações cruzadas entre as plaquinas, a involucrina e outras proteínas desmossômicas, o que resulta em mudanças drásticas nas propriedades dinâmicas das junções celulares e nas interações do citoesqueleto. Em uma segunda etapa, as células das camadas suprabasais acumulam corpos lamelares, derivados do complexo de Golgi, que contêm lipídeos posteriormente liberados no meio extracelular após fusão desses corpos lamelares com a membrana plasmática. Na etapa final, a transglutaminase 3 promove ligações cruzadas entre a loricrina, que é insolúvel, e as SPRs, que são muito solúveis. Isto resulta na solubilização da loricrina. Ao mesmo tempo, a maioria das organelas, microtúbulos, microfilamentos e outras proteínas juncionais são degradadas. Os filamentos de queratina consistindo principalmente dos tipos 1, 2e e 10, ligam-se às moléculas remanescentes de plaquinas, involucrina, loricrina e SPRs. As células mortas corneificadas mostram basicamente pacotes de filamentos intermediários e estão embebidas em lamelas lipídicas, formando uma barreira mecânica permeável à água.

Figura 4: Etapas da formação do envelope corneificado das células da epiderme, segundo Kalinin et al. (2001), com modificações.

Os genes que codificam as proteínas exclusivas do envelope corneificado (loricina, SPRs, involucrina e LEPs) possuem uma organização similar e estão mapeados em uma mesma região cromossômica (1q21) conhecida como “complexo de diferenciação da epiderme” (Mischke et al., 1996; Martin et al., 2004). Da mesma forma, sua estrutura protéica apresenta semelhanças, com alto conteúdo de lisina e glutamina. Essas características sugerem que esse grupo evoluiu de um gene ancestral após várias duplicações (Figura 5) (Backendorf & Hohl, 1992).

As proteínas pequenas ricas em prolina (SPRs)

As proteínas SPRs compreendem uma sub-classe específica de precursores da camada córnea, codificados por uma família multi-gênica mapeada no complexo de diferenciação epidermal (Figura 6A) (Gibbs et al., 1993). Essa família compreende onze membros, todos com dois exons constitutivos, o segundo com a região codificadora completa. São eles: dois genes *SPRR1* (A e B) sendo que o *SPRR1A* possui duas isoformas, seis genes *SPRR2* (A, B, D, E, F, G), um único gene *SPRR3* (também com duas isoformas) e um *SPRR4*, além de um pseudogene *SPRR2C* (Gibbs et al., 1993; Cabral et al., 2001; Fischer; Backendorf, 2007). As sequências nucleotídicas das isoformas de *SPRR1A* possuem similaridade acima de 90%, mas os produtos proteicos são idênticos; o mesmo é válido para as isoformas de *SPRR3* (Gibbs et al., 1993; De Heller-Milev et al., 2000).

As proteínas SPRs (6 a 18 kDa) possuem uma estrutura similar, com os terminais amino e carboxila ricos em lisina (K) e glutamina (Q), e um domínio central de motivos *turn-β*, com 2-20 repetições de oito ou nove unidades ricas em prolina (P) (Figuras 6B e 7). As regiões ricas em lisina e glutamina dos N- e C-terminais são substratos de transglutaminases para ligações cruzadas, que criam uma rede de proteínas, particularmente com a abundante loricina, e conferem resistência mecânica ao envelope córneo (Steinert et al., 1998; Kartasova et al., 1996). O domínio central, rico em glicina

(G) e serina (S), forma uma estrutura flexível não organizada, que contribui para a elasticidade do envelope (Candi et al., 2005).

Embora os N- e C-terminais mostrem similaridade com outras proteínas (como involucrina e loricrina), a região central varia tanto no número de repetições quanto na sequência consenso e é responsável pela classificação das SPRs (Cabral et al., 2001; Backendorf et al., 1992). Uma das classificações proposta (Cabral et al., 2001) considera dois grupos de SPRs: o primeiro (SPR-1A ou cornifina-A ou 19kDa pancornulina; SPR-1B, SPR-3 ou esofagina ou cornifina-B ou 22KDa pancornulina; e SPR-4) caracterizado por N-terminal longo e C-terminal curto, um motivo repetido de 8 aminoácidos e maior diversidade na região central, e o segundo grupo (SPR-2) caracterizado por N-terminal curto e C-terminal longo e um motivo repetido de 9 aminoácidos.

Figura 5: Diagrama hipotético mostrando a evolução dos genes *SPRRs*, *involucrina* e *loricrina* a partir de um ancestral comum. Os domínios N- e C- terminal, conservados em cada proteína, estão representados por quadrados. O domínio central com repetições está representado pelos símbolos: triângulo (*loricrina*); losango (*involucrina*); círculos (*SPRR1*, *SPRR2* e *SPRR3*). A letra n representa o número de repetições: 6 para *SPRR1*, 3 para *SPRR2*, 14 para *SPRR3*, e 39 para *involucrina*. As setas pontilhadas indicam uma rota alternativa, que liga a evolução das *SPRR1* e *SPRR3* com a *involucrina* (duplicação do domínio N-terminal). H, similaridade entre os membros da mesma sub-família. D, divergência dos genes (modificado de Gibbs et al., 1993).

A

B

SPR-1A	1	MNSQQQ--KQ	PCTPPPQPPQ	QOVKQPCQPP	P--QEPICP	KTKEPCPKV	PEPCPKVPE	PCQPKVPEPC	65
SPR-1B	1	MSSQQQ--KQ	PCTPPPQPPQ	QOVKQPCQPP	P--QEPICP	KTKEPCPKV	PEPCPKVPE	PCQPKVPEPC	65
SPR-2A	1	MSYQQQQCKQ	PCQPPPVCP	PKCEPCPP	K--CEPCPP	PKCP-QPCP	PQQCQKYP	-----	62
SPR-2B	1	MSYQQQQCKQ	PCQPPPVCP	PKCEPCPP	K--CEPCPP	PKCP-QPCP	PQQCQKYP	-----	62
SPR-2D	1	MSYQQQQCKQ	PCQPPPVCP	PKCEPCPP	K--CEPCPP	PKCP-QPCP	PQQCQKYP	-----	62
SPR-2E	1	MSYQQQQCKQ	PCQPPPVCP	PKCEPCPP	K--CEPCPP	PKCP-QPCP	PQQCQKYP	-----	62
SPR-2F	1	MSYQQQQCKQ	PCQPPPVCP	PKCEPCPP	K--CEPCPP	PKCP-QPCP	PQQCQKYP	-----	62
SPR-2G	1	MSYQQQQCKQ	PCQPPPVCP	PKCEPCPP	K--CEPCPP	PKCP-QPCP	PQQCQKYP	-----	62
SPR-3	1	MSSYQQ--KQ	TFTPPPQPPQ	QOVKQPSQPP	P--QEIFVP	TTKEPCSKV	PQPGNTKIP	PGCTKVPPEG	65
SPR-4	1	MSSQQQQRQ	QCCPPQRAQ	QOVKQPCQPP	PVKCOETCP	KTKEPCPKV	KKQCPKGTI	TIIPAQQKCP	63
SPR-1A	66	QPKVPEPCPS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	72
SPR-1B	66	HPKVPEPCPS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	72
SPR-2A	63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	65
SPR-2B	63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	65
SPR-2D	63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	65
SPR-2E	63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	65
SPR-2F	63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	65
SPR-2G	64	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	66
SPR-3	66	CTKVPEPGCT	KVPEPGCTKV	PEPGCTKVPE	PGCTKVPEPG	YTKVPEPGSI	KVPDQGFIF	PEPGAIVPE	135
SPR-4	64	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	66
SPR-1A	73	-----	-----	TVTPAPAQ--	--KTKQK	-----	-----	-----	89
SPR-1B	73	-----	-----	IVTPAPAQ--	--KTKQK	-----	-----	-----	89
SPR-2A	66	-----	-----	PVTPSPPCQS	KYPPKSK	-----	-----	-----	72
SPR-2B	66	-----	-----	PVTPSPPCQP	KYPPKSK	-----	-----	-----	72
SPR-2D	66	-----	-----	PVTPSPPCQP	KYPPKSK	-----	-----	-----	72
SPR-2E	66	-----	-----	PVTPSPPCQP	KYPPKSK	-----	-----	-----	72
SPR-2F	66	-----	-----	PVTPSPPCQP	KYPPKSK	-----	-----	-----	72
SPR-2G	67	-----	-----	PVQBYPPCQP	KYPPKSK	-----	-----	-----	73
SPR-3	136	QGYTKVPVPG	YTKLPEPCPS	TVTPGPAQ--	--KTKQK	-----	-----	-----	169
SPR-4	67	-----	-----	-----	SAQQA	-SKSKQK	-----	-----	79

Figura 6: (A) Representação esquemática do complexo de diferenciação epidermal no cromossomo 1 (1q21), 151,930,000-153,620,000 pb, mostrando a posição dos genes *SPRRs*. (B) Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas *SPRs*. Os N- e C-terminais são indicados por seta dupla e os aminoácidos idênticos em uma posição específica em pelo menos cinco *SPRs* são mostrados em cinza. As repetições de 8-9 aminoácidos são indicados por retângulos nas sequências de SPR-1A, SPR-2A, SPR-3 e SPR-4 (modificado de Henry et al., 2012).

A ativação dos genes *SPRRs* é modulada *in vitro* por fatores indutores de diferenciação, como forbol, retinóides, monofosfato de adenosina (AMP) cíclico e interferon γ (Candi et al., 2005). Sua expressão também é afetada *in vivo* por radiação UV, especialmente no caso dos genes *SPRR2* (Tong et al., 2006).

A análise do promotor de *SPRR2A*, *SPRR3*, *SPRR1A* e *1B* tem revelado a presença de sítios Oct-11, Ets, AP-1, ATF, ISRE, TRE e GC Box que se ligam a diferentes fatores de transcrição (Fischer et al., 1996; 1999; Sark et al., 1998; Reddy et al., 2003). Mais recentemente, Fischer e cols. (2007) detectaram elementos de resposta dependentes de cálcio no promotor do *SPRR3*, reforçando a idéia de que esses íons possuem um papel importante na regulação das SPRs e na diferenciação terminal dos queratinócitos. A participação de diferentes elementos no controle da expressão dessa família gênica sugere que, durante sua evolução, a diversidade das seqüências reguladoras recebeu mais atenção que a diversificação da estrutura. Isso implica que o controle da dosagem protéica é mais importante para o desempenho de sua função que a complexidade estrutural (Cabral et al., 2001).

As classes de SPRs mostram um padrão altamente específico de expressão diferencialmente regulada em vários tipos de epitélio durante o envelhecimento ou em situações de doenças e, como já referido acima, em resposta a estímulos ambientais (revisto por Fischer et al., 1996). Sua seqüência contém resíduos de serina e treonina que são substratos para quinases e, portanto, podem ser fosforilados em cascatas de sinalização (Fischer et al., 1999).

A proteína SPR-1 tem sido observada em epiderme e mucosa oral, incluindo língua e gengiva, a SPR-2 em epiderme folicular e interfolicular e em papilas linguais e a SPR-3 não tem sido detectada na epiderme, mas está presente em epitélio escamoso interno como o da cavidade bucal e do esôfago (Hohl et al, 1995; De Heller-Milev et al., 2000; Lee et al., 2000). O banco de dados UNIGENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) confirma a presença de transcritos desses genes em vários sítios anatômicos, principalmente em cavidade oral, laringe e faringe.

São interessantes as referências de expressão das SPR em órgãos nos quais não há epitélio escamoso estratificado, como útero (Song et al., 1999) e ovário de roedores (Tesfaigzi, Carlson, 1996b). No momento, não existem explicações para esses achados, mas é possível que tais proteínas levem à predisposição de metaplasia escamosa nesses tecidos (Jetten et al 1996; Song et al., 1999) ou estão envolvidas em morte celular programada e adaptação a estímulos ou insultos (Cabral et al., 2001).

Em condições de doença, a SPR-1 e a SPR-2 foram observadas em epiderme psoriática em níveis muito mais altos que em epiderme normal (Hohl et al, 1995; Hoffjan & Stemmler, 2007) e em muitas outras lesões inflamatórias de pele (De Heller-Milev et al., 2000; Jarzab et al., 2010). Associação de psoríase com polimorfismos nos genes *SPRRs* também já foram citadas (Kainu et al., 2008).

Os transcritos de *SPRR1* já foram detectados com níveis elevados em camundongos expostos à fumaça do cigarro (Tesfaigzi et al., 1996). Do mesmo modo, um aumento da expressão de SPR-2 no intestino delgado foi referida após indução de inflamação gastrointestinal por substâncias alergênicas (Zimmermann et et al., 2005) e a SPR-1 em metaplasia escamosa ocular autoimune (Li et al., 2008). Esses achados podem estar relacionados com a ativação da proliferação epidérmica e com a presença de citocinas inflamatórias, ou com a ativação de elementos que respondem a hormônios (Oct-11) ou interferon (ISRE) presentes na região promotora de *SPRRs* (De Heller-Milev et al., 2000).

Em relação a processos neoplásicos, a literatura é relativamente escassa. Em uma busca no banco de dados MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) limitada para humanos e utilizando os termos MESH “Cornified Envelope Proline-Rich Proteins” e “Neoplasia”, foram obtidos 32 artigos (acessado em 08/07/2012), alguns deles não diretamente relacionados com as proteínas SPRs. Um resumo dos dados é apresentado na Tabela 1 e alguns desses artigos são comentados a seguir.

Por exemplo, Cho e colaboradores (2010) detectaram expressão elevada de SPR-3 em tumores colorretais, o que foi associado a invasão linfovascular. Esses autores

também observaram que a indução de expressão dessa proteína resultava em proliferação celular acelerada, ativação da via AKT e níveis de p53 diminuídos. O mesmo foi referido em câncer de mama por Kim e colaboradores (2012), mas com associação a estágios menos avançados da doença. Por outro lado, níveis baixos de SPR-3 (Abraham et al. 1996, Zhang et al. 2008; Zinovyeva, 2010) foram detectados em carcinomas de esôfago, ao contrário dos tecidos normais correspondentes.

Em relação a outras SPRs, tanto expressão elevada da proteína (SPR-I) como expressão diminuída de transcritos (*SPRR1A* e *SPRR2A*) foram descritas pela literatura em carcinomas epidermóides de pulmão (Hu et al, 1998) e de esôfago, respectivamente (Luo et al., 2004).

Na carcinogênese cutânea, De Heller-Milev e colaboradores (2000) observaram expressão diferencial de *SPRR3* em queratoacantoma, ceratose liquenóide, doença de Bowen e carcinoma epidermóide de pele, e concluíram que essa proteína pode ser utilizada como diagnóstico.

Em relação aos carcinomas de cabeça e pescoço, Nishitani e colaboradores (2002), estudando queratinócitos humanos orais normais antes e após imortalização por HPV 16, observaram uma expressão basal alta de SPR-2 nesses últimos, associada com proliferação celular e sugeriram sua participação em estágios iniciais da carcinogênese oral. Resultados opostos foram observados Lohman e colaboradores (1997b), que detectaram níveis reduzidos de SPR-2 em linhagens de queratinócitos derivadas de carcinoma epidermóide de língua e pele. Dois estudos de nosso grupo (Silveira et al., 2008; Polachini et al., comunicação pessoal) também revelaram baixos níveis de transcritos dos genes *SPRR2F*, *SPRR2E* e *SPRR3* em bibliotecas SAGE de tumores de laringe, ou da proteína SPR-3 em carcinoma oral, respectivamente. Em vista dos resultados contraditórios e escassos da literatura e considerando a frequência desses carcinomas na população, torna-se interessante a investigação do papel das proteínas SPRs no fenótipo celular de carcinomas de cabeça e pescoço.

Tabela 1. Alterações de expressão dos genes *SPRRs* e de seus produtos em neoplasias e linhagens celulares.

Estudo	No. de amostras	Tecido de origem de linhagens (L) Lesão pré-maligna ou Tumor primário (T) Tecido normal (N)	Linhagem celular/outras	Nível de expressão de genes <i>SPRRs</i> e de seus produtos <i>SPRs</i>	
				Elevado	Reduzido
Robinson et al. (1994)	3	(T) Queratocisto odontogênico			SPR-1A
Yaar et al. (1995)	1	(N) Queratinócitos normais (L) Carcinoma de pele	SCC12F		<i>SPRR1</i>
Abraham et al. (1996)	6	(T) Carcinoma de esôfago			<i>SPRR3</i>
Lohman et al. (1997)		(L) Carcinoma de língua (L) Carcinoma de pele (L) Queratinócitos normais	SCC4, SCC12B2, SCC12F2, SCC13 SCC15 NHK		<i>SPRR2</i>
Fujimoto et al. (1997)	11	Pele - Doenças inflamatórias e proliferativas (N) Mucosa oral normal e pele normal		<i>SPRR1A</i> <i>SPRR1B</i>	
Hu et al. (1998)	63	(T) Carcinoma de pulmão			SPR-1
DeMuth et al. (1998)		(L) Epitélio brônquico maligno (L) Epitélio brônquico normal	H446, H82, N417, A549, A427, H2126, Calu-1, SW900, H520, H322, H661, H460		<i>SPRR1</i>
De Heller-Milev et al. (2000)	80	Pele – Dermatoses (T) Doença de Bowen, queratoacantoma, carcinoma		SPR-1 e SPR-2	SPR-3
Zucchini et al. (2000)	6	(T) Carcinoma anal		<i>SPRR2A</i>	
Lau et al. (2000)		(L) Carcinoma broncogênico (L) Epitélio traqueobronquial	HTBE, HBE1, BEAS-2B H460		<i>SPRR1</i> e SPR-1
Lee et al., (2000)		(L) Queratinócitos normais de gengiva	NHGK	SPR-1	
Patterson et al. (2001)		(L) Epitélio brônquico e queratinócitos normais (L) Diferentes neoplasias	HBE1, BEAS-2B A549, NCI-H520, H358, A431, H661, Caco-2, A172		<i>SPRR1B</i>
Nishitani et al. (2002)		(L) queratinócitos orais imortalizados por HPV (L) Queratinócitos orais normais	HOK16E6E7 NHOK		<i>SPRR2</i>
Jarnik et al. (2002)	1	(N) Pele normal de camundongos <i>knockout</i> para loricina		SPR-1	
Tesfaigzi et al. (2003)		(T) Carcinoma de pulmão (L) Carcinoma de pulmão e ovário	CL25, I033, NCIH596, SK- MES-1, CHO		<i>SPRR1B</i>
Katou et al. (2003)	21	(N) Pele normal		SPR-2	SPR-3
Luo et al. (2004)	8	(T) Carcinoma de esôfago			<i>SPRR1A</i> e <i>SPRR2A</i>

Kimchi et al. (2005)	24	(T) Carcinoma de esôfago (T) Metaplasia de Barretts			<i>SPRR3</i>
Tong et al. (2006)	1	(L) Epitélio córneo normal	HCEC	SPR-1 e SPR-2	
Li et al., 2008	68	(T) Metaplasia escamosa ocular		<i>SPRR1B</i>	
Zhang et al. (2008)	8	(T) Carcinoma de esôfago (L) Carcinoma de esôfago	EC9706, KYSE30, KYSE150 KYSE180, KYSE410, KYSE450, KYSE510, NEC		SPR-3
Silveira et al. (2008) 3 bibliotecas SAGE	3	(T) Carcinoma de laringe	Bibliotecas SAGE de laringe		<i>SPRR2F, SPRR2E e SPRR3</i>
Maru et al. (2009)	11	(T) Carcinoma de esôfago			<i>SPRR2C</i>
Cho et al. (2010)	35	(T) Carcinoma colorretal (L) Carcinoma colorretal (L) Cólon normal	FHC, CCD841, AMC5	SPR-3	
Jarzab et al. (2010)	33	Pele - Dermatite atópica		<i>SPRR1A e SPRR2C</i>	
Zinovyeve et al. (2010)	21	(T) Carcinoma de esôfago			<i>SPRR3</i>
de A Simão et al. (2011)	84	(T) Carcinoma de esôfago		<i>SPRR3 isoforma 1</i>	
Pasini et al. (2012)	69	(T) Carcinoma de cavidade oral			<i>SPRR2B</i>
Kim et al. (2012)	241	(T) Carcinoma de mama		<i>SPRR3</i>	

Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é uma neoplasia maligna que atinge a cavidade oral, a faringe e a laringe. Compreende 95% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço e é o sexto tipo mais frequente de câncer. São esperados aproximadamente 600 mil novos casos por ano no mundo, dos quais dois terços com lesões em estágios avançados ao diagnóstico e/ou envolvimento de linfonodos regionais (Yan et al., 2010) e apenas 40-50% com sobrevida acima de 5 anos (revisto por Leemans et al., 2010). No Brasil, são estimados para o ano de 2012 cerca de 14 mil novos casos de câncer oral e 6 mil de laringe (Ministério da Saúde, 2012).

Os principais fatores de risco para CECP são o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas (Hashibe et al., 2009). Existem fortes evidências, tanto epidemiológicas quanto experimentais, de que a infecção por papilomavírus (HPV) do tipo 16 também é responsável por uma fração dos tumores de cabeça e pescoço, em especial os de orofaringe (IARC, 2007).

A conduta clínica do CECP ainda é difícil apesar do grande avanço na compreensão de sua etiologia. Não existem ainda terapias eficazes e pouco agressivas que atuem apenas nas células malignas e não tenham qualquer efeito sobre as células normais (Mehrotra et al., 2011). Embora lesões iniciais sejam mais facilmente tratadas e curadas, sua detecção não é simples e suas características morfológicas não possuem valor prognóstico suficiente para cálculo do risco da doença (Molinolo et al., 2009).

A evolução clínica e a resposta à terapia dos CECPs são bastante variáveis, mesmo nos casos histologicamente semelhantes (Takes et al., 1998). Alguns pacientes, por exemplo, manifestam lesões múltiplas no mesmo sítio anatômico ou em outros sítios do trato aerodigestivo superior, uma situação provavelmente relacionada com a exposição crônica de toda a mucosa a insultos carcinogênicos, explicada por Slaughter e colaboradores (1953), como cancerização de campo. Essas características tornam a investigação das alterações desencadeadas durante o processo de malignização muito importante na identificação de marcadores úteis para o rastreamento de pessoas em

risco de desenvolver a doença ou de apresentar lesões múltiplas e para a previsão do curso da doença ou da resposta à terapia (Wreesmann et al., 2004).

O modelo da progressão molecular dos tumores de cabeça e pescoço sugere que a hiperplasia benigna já contém algumas alterações genéticas, como a inativação do gene *p16^{INK4A}*. Segundo esse modelo, a progressão clínica para displasia, carcinoma *in situ* e invasivo está associada a outras alterações, como mutações no gene *TP53*, amplificação do gene da ciclina D1 e *EGFR*, inativação do *PTEN*, além de deleções de diferentes segmentos do genoma (revisto por Leemans et al., 2010). Tais alterações contribuem para o fenótipo neoplásico que, de acordo com Hanahan e Weinberg (2011), está relacionado com proliferação celular aumentada, insensibilidade a fatores supressores de crescimento, resistência a apoptose, angiogênese sustentada, reprogramação do metabolismo energético, evasão ao ataque imune e capacidade para invasão e metástase. Se essas características puderem ser bloqueadas por um fármaco, provavelmente será possível deter ou alterar o curso do processo tumoral.

No presente, os marcadores de prognóstico mais utilizados nas decisões sobre o tratamento a ser utilizado em CECp são o sítio do tumor primário e a presença de metástases regionais ou distantes (Greenman et al., 2000). Entretanto, a determinação do status nodal não é simples. No caso de avaliação clínica, os resultados falsos positivos e falsos negativos são frequentes. A avaliação por exames histopatológicos resulta algumas vezes em falhas na detecção da doença metastática. A precisão do estadiamento pode, entretanto, ser melhorada com a utilização de técnicas moleculares (Becker et al., 2004).

Um ponto crítico no estudo dos tumores de cabeça e pescoço é a definição da subpopulação de células iniciadoras, que comportam-se como células tronco. Existem indícios de que essas células residem em nichos perivasculares na frente invasiva e, como outras células tronco, são indiferenciadas e com capacidade de renovação limitada (Zhang et al., 2012). Hombach-Klonisch et al. (2008) sugerem que nos carcinomas de cabeça e pescoço, as células em diferenciação dos compartimentos supra-basais do

epitélio desviam-se da rota de diferenciação pré-determinada e transformam-se em células neoplásicas.

II - OBJETIVOS

Considerando os dados obtidos previamente por nosso grupo sobre alteração de expressão gênica em carcinomas de cabeça e pescoço, o presente trabalho teve como objetivo investigar a participação das proteínas pequenas ricas em prolina no desenvolvimento desses tumores e no fenótipo da célula neoplásica. Os seus resultados podem contribuir para o entendimento da biologia dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e para a caracterização das vias moleculares relacionadas com sua patogenia.

Os objetivos específicos incluem:

- 1- Investigar as relações filogenéticas entre os genes *SPRRs*;
- 2- Avaliar o padrão de expressão dos genes *SPRRs* (*SPRR1A*, *SPRR1B*, *SPRR2A*, *SPRR2B*, *SPRR2C*, *SPRR2D*, *SPRR2E*, *SPRR2F*, *SPRR2G*, *SPRR3* e *SPRR4*) em mucosa oral normal e em linhagens de células epiteliais procedentes de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, bem como em tumores primários desse sítio anatômico;
- 3- Investigar o potencial dos genes *SPRRs* como marcadores do fenótipo metastático;
- 4- Avaliar o efeito do anti-inflamatório anexina A1 na expressão dos genes *SPRRs*;
- 5- Avaliar o efeito da expressão ectópica de *SPRR2E* no comportamento e no fenótipo de células epiteliais neoplásicas;
- 6- Sub-clonar os genes *SPRR4* e *SPRR2E* em vetor de clonagem específico para bactérias.

III - MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

No presente estudo, foram estudadas as linhagens celulares Hep-2 (originalmente descrita como sendo de laringe, mas com contaminação de linhagem de carcinoma de colo de útero), FaDu (procedente de carcinoma de orofaringe), UM-SCC-38 (carcinoma de tonsila pilar) e SCC-9 (carcinoma de língua). As duas primeiras linhagens foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Otávia Luisa Silva Damas de Caballero, Instituto Ludwig, NY. A linhagem UM-SCC-38 foi cedida pelo Prof. Dr. Thomas Carey da Universidade de Michigan e a linhagem SCC-9 foi cedida pelo Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Tabela 2). Além dessas linhagens, foi estudada uma amostra de RNA de queratinócitos bucais humanos normais cultivados pela Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

Tabela 2. Características das linhagens utilizadas no estudo s a *American Type Culture Collection* (ATCC).

Linhagem	Características	Dados dos pacientes	
		Idade	Sexo
Hep-2	Linhagem celular epidermóide originalmente descrita como sendo de carcinoma de laringe, com contaminação pela linhagem HeLa (ATCC: CCL-23)	Não consta	Não consta
FaDu	Carcinoma epidermóide de células escamosas de faringe (ATCC: HTB-43)	56	Masculino
SCC-9	Carcinoma epidermóide de células escamosas de língua (ATCC: CRL-1629)	25	Masculino
UM-SCC-38	Carcinoma epidermóide de tonsila T2N2aM0, estágio IV, moderadamente diferenciado, sem terapia prévia	60	Masculino

Os tumores primários estudados foram procedentes de 44 pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, dos quais foram obtidas amostras do tumor e de sua respectiva margem após ressecção cirúrgica. Os casos foram classificados em dois sub-grupos: aqueles com presença (N+) ou ausência (N0) de metástases em linfonodos regionais, e o sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) da *Union Internationale Contre le Cancer* – UICC (<http://www.uicc.org/>). As letras TNM fazem referência, respectivamente, à extensão do tumor primário (T1 a T4), à ausência ou presença de metástases em um ou mais linfonodos regionais (N0 a N3) e à presença ou ausência de metástases distantes (M0 ou M1).

O conjunto de amostras compreendeu 44 pares de tumor primário-margem correspondente, incluindo: 19 pares de carcinomas de laringe (8 N0 e 11 N+), 8 pares de carcinoma de língua (4 N0 e 4 N+) e 17 de soalho de boca (10 N0 e 7 N+). Na Tabela 3 estão apresentados os dados sobre idade, sexo, exposição a fumo e álcool, sítio primário e características anatomopatológicas.

Essas amostras foram coletadas pelos centros participantes do Projeto Temático “Marcadores de Agressividade em Tumores de Cabeça e Pescoço” (processo FAPESP 04/12054-9, aprovado pelo CONEP com parecer nº 1763/2005). Imediatamente após a cirurgia, foram armazenadas em nitrogênio líquido e submetidas à macrodissecção por um médico patologista, que confirmou a presença de pelo menos 70% de células tumorais nos carcinomas e ausência dessas células nas margens cirúrgicas.

Em função dos dados obtidos de expressão gênica obtidos pelo grupo (Silveira et al., 2008), um dos sítios anatômicos avaliados foi a laringe (C32, s o Código Internacional de Doenças / CID-10). Além disso, amostras de outros dois subsítios de cabeça e pescoço foram utilizadas: língua (C02) e assoalho de boca (C04).

Para padronização do protocolo destinado à análise de expressão gênica e para construção de curvas padrão nos ensaios de PCR em tempo real, também foram utilizadas amostras de esôfago e gengiva obtidas de autópsia de indivíduos sem câncer, armazenadas no banco de amostras do laboratório.

Tabela 3. Lista de amostras de CECP e suas respectivas características. M=masculino; F=feminino.

Caso	Sexo	Idade	Fuma	Etilista	Sítio	TNM	Estádio	Diferenciação Histológica	Infiltração Vascular Sanguínea	Infiltração Linfática	Invasão Perineural	Infiltrado Inflamatório peri-tumoral	Óbito
CP1/0021	M	43	Sim	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderada	Presente	Presente	Ausente	Moderado	Não
CP1/0032	M	64	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N2C M0	IV	Pouco diferenciado	Ausente	Presente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP1/0056	F	54	No passado	No passado	Laringe	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não
CP1/0057	M	57	Sim	No passado	Língua	T4 N2B M0	IV	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Outras Causas
CP1/0075	M	54	Sim	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não
CP1/0083	M	72	No passado	No passado	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não
CP1/0151	M	47	Sim	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP1/0191	M	63	Sim	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP1/0200	M	55	Sim	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Não
CP1/0213	M	68	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N1 M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Presente	Ausente	Escasso	Não
CP1/0228	M	40	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N2C M0	IV	Moderada	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Não
CP1/0240	M	75	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não
CP1/0262	M	62	No passado	Sim	Língua	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP1/0348	M	51	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP1/0357	M	76	Nunca	Nunca	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP1/0359	M	55	Sim	Sim	Laringe	T4 N0 M0	IV	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP1/0363	M	64	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N2C M0	IV	Moderada	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Não
CP1/0366	M	49	No passado	Sim	Soalho de Boca	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente		Não
CP1/0370	M	55	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP1/0384	M	46	No passado	Sim	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não
CP1/0385	M	39	Nunca	Nunca	Laringe	T4 N0 M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP2/0051	M	46	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N2B M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP2/0096	M	46	Sim	Sim	Laringe	T2 N1 M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Não
CP2/0122	M	56	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N2B M0	IV	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia

CP2/0168	F	70	No passado	Nunca	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Outras Causas
CP2/1002	M	59	Sim	Sim	Língua	T2 N2C M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	Pela Neoplasia
CP3/0018	M	61	Sim	No passado	Laringe	T4 N2B M0	IV	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0031	M	54	Sim	Sim	Laringe	T4 N2C M0	IV	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0033	M	51	Sim	No passado	Soalho de Boca	T3 N0 M0	III	Moderada	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não
CP3/0050	F	44	Sim	No passado	Língua	T2 N1 M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0076	M	64	No passado	No passado	Laringe	T4 N2B M0	IV	Pouco diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não
CP3/0085	M	59	Sim	Sim	Laringe	T4 N3 M0	IV	Pouco diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Não
CP3/0102	M	49	Sim	Sim	Laringe	T2 N1 M0	III	Bem diferenciado	Presente	Ausente	Ausente	Escasso	Não
CP3/0118	M	45	Sim	Sim	Língua	T4 N3 M0	IV	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não
CP3/0119	M	67	Sim	Sim	Laringe	T4 N2C M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Presente	Presente		Pela Neoplasia
CP3/0120	F	46	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2 N0 M0	II	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0125	M	63	No passado	No passado	Laringe	T4 N3 M0	IV	Pouco diferenciado	Presente	Presente	Presente	Moderado	Não
CP3/0153	M	49	Sim	No passado	Laringe	T3 N3 M0	IV	Moderada	Presente	Presente	Presente	Moderado	Pela Neoplasia
CP3/0280	M	52	Sim	Sim	Soalho de Boca	T1 N2B M-X		Moderada	Ausente	Ausente	Presente		Não
CP3/0377	M	78	No passado	No passado	Laringe	T4 N0 M-X		Moderada	Ausente	Ausente	Presente		Outras Causas
CP3/0411	M	49	Sim	Sim	Laringe	T4 N2B M-X		Moderada	Presente	Ausente	Presente	Intenso	Outras Causas
CP3/0464	M	79	Sim	No passado	Laringe	T4 N2B M-X		Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	Pela Neoplasia
CP4/0016	F	52	Sim	Sim	Laringe	T1 N0 M-X		Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não
CP4/0024	M	45	Sim	No passado	Laringe	T4 N0 M-X		Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	

Métodos

Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada pelo programa MEGA (versão 4) (Tamura et. al, 2007), utilizando a ferramenta Muscl para alinhamento de sequências. O método selecionado foi o *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987), que constrói a árvore filogenética a partir de uma matriz com medidas de distâncias entre pares.

As seqüências dos RNAs mensageiros dos genes *SPRRs* humanos, de suas isoformas e do pseudogene *SPRR2C* utilizadas para a análise filogenética foram obtidas do banco de dados *Reference Sequences* (RefSeq) do *The National Center for Biotechnology Information* ou NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Sequências de referência dos transcritos de *SPRRs* obtidas do *The National Center for Biotechnology Information* e utilizadas para construção de árvore filogenética.

GENE	NÚMERO DE ACESSO
<i>SPRR1A</i> – isoforma 1	NM_001199828.1
<i>SPRR1A</i> – isoforma 2	NM_005987.3
<i>SPRR1B</i>	NM_003125.2
<i>SPRR2A</i>	NM_005988.2
<i>SPRR2B</i>	NM_001017418.1
<i>SPRR2C</i>	NR_003062.1
<i>SPRR2D</i>	NM_006945.4
<i>SPRR2E</i>	NM_001024209.2
<i>SPRR2F</i>	NM_001014450.1
<i>SPRR2G</i>	NM_001014291.3
<i>SPRR3</i> - isoforma 1	NM_005416.2
<i>SPRR3</i> - isoforma 2	NM_001097589.1
<i>SPRR4</i>	NM_173080.1

Cultura de células

Alíquotas das linhagens celulares a serem estudadas foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria a 37°C por alguns min. A seguir, receberam 1mL de meio de cultura e foram transferidas para frascos de cultivo de 270mL contendo 9mL de meio de cultura. O tipo de meio de cultura variou com a linhagem. Assim, o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM (Cultilab, Campinas, Brasil) foi utilizado para crescimento e manutenção das células UM-SCC-38; o meio MEM (Cultilab) com piruvato de sódio (100mM, Invitrogen, São Paulo, Brasil) foi utilizado para Hep-2 e FaDu; e o meio DMEM/F12 (Invitrogen) com vancomicina (50µg/mL, Acros Organics, NJ, EUA), hidrocortisona (0,4µg/mL, Sigma, São Paulo, SP, Brasil), gentamicina e fungizone (50µg/mL e 0,3µg/mL (Cultilab) para SCC-9. Todos os meios foram suplementados com soro fetal bovino/SFB 10% (Cultilab), aminoácidos não essenciais (10mM, Invitrogen), L-glutamina (0,1µg/mL (Invitrogen) e solução de 0,1% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). As linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h, até se fixarem no substrato.

As culturas foram monitoradas em microscópio de fase e os meios de cultura substituídos a cada três ou quatro dias. Quando a subconfluência atingiu aproximadamente 70%, as células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1X estéril e destacadas com 1 ml ou 2 ml de solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02%, (Cultilab) por 2 min. A tripsina foi inativada com meio de cultura contendo SFB 10% e as células obtidas foram subdivididas em dois frascos para novo cultivo ou foram congeladas em nitrogênio líquido para manutenção do estoque.

A partir de culturas com 70% de subconfluência, foram iniciadas seis réplicas de cada linhagem celular contendo 1x10⁶ células/réplica, obtidas após contagem em câmara de *Neubauer* e no *Countess® Automated Cell Counter* (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil). Depois das primeiras 24 h, as células foram lavadas com PBS 1X e o meio foi substituído por meio sem SFB para permitir sincronização do ciclo celular na fase G₀.

Novamente, após 24 h, o meio foi substituído por meio completo, liberando as células de G₀. A partir desse ponto, foram contadas 24, 48 e 72 h para bloqueio com solução de tripsina/EDTA da cultura de duas réplicas para cada tempo, destinadas à extração de RNA, DNA e proteínas totais. O DNA e as proteínas foram armazenados em -20°C e -80°C, respectivamente, para estudos futuros.

Indução da expressão gênica

A indução da expressão permanente do gene *SPRR2E* na linhagem celular Hep-2 foi realizada com o vetor recombinante pCMV6-AC (OriGene Technologies, Rockville, EUA) contendo o gene *SPRR2E*. Esse vetor (Figura 9) apresenta o gene de resistência à geneticina (NEO^R) que permite a seleção das células transfectadas e a eliminação daquelas sem o vetor e, portanto, sem a expressão da proteína recombinante. Como controle negativo, foram utilizadas células transfectadas com o vetor sem o gene *SPRR2E*, que foi obtido após sua digestão com as enzimas *EcoRI* (Fermentas, Maryland, EUA) e *XhoI* (Fermentas). Em paralelo, também foram cultivadas células Hep-2 em meio contendo o vetor.

As células foram cultivados em garrafas médias (75cm²) até a obtenção de confluência de 90%. No dia do experimento, foram tripsinizadas e, em seguida, semeadas em placas de 24 poços (3x10⁶ células/poço), em meio sem antibiótico. Para transfecção, foi utilizado o sistema Neon (Invitrogen) com os reagentes específicos do kit, sendo testados 23 diferentes intensidades de pulsos elétricos para padronização e seleção da melhor condição (1000 volts, 1 pulso, comprimento do pulso de 40 seg) quantidade de vetor utilizada para a reação foi de 5 µg/poço. Vinte e quatro h após a transfecção, o meio foi substituído por meio de cultura completo com o antibiótico de seleção geneticina (concentração final de 700µg/mL).

A cada 48 h, o meio de cultura foi substituído por meio novo com geneticina em todos os poços com as células transfectadas e nos controles.

Para confirmação do sucesso do experimento, uma amostra das células transfectadas e seus controles seguiu para extração de RNA, confecção de cDNA e amplificação do gene *SPRR2E* por PCR em tempo real.

A

B

Figura 9. A. Esquema do vetor de superexpressão contendo o gene *SPRR2E*, com as regiões que conferem resistência para os antibióticos Ampicilina e Neomicina (Geneticina), a sequência promotora do CMV (citomegalovírus) e os sítios de restrição; **B.** Esquema linear do vetor apresentando as regiões dos sítios de restrição e a sequência Kozac.

Avaliação de morfologia, índice de proliferação celular, migração e invasão

Para avaliar seu potencial proliferativo, as células transfectadas e seus controles foram cultivadas em réplicas com 1×10^4 células/poço por 24 h, em meio sem SFB com geneticina, como descrito previamente. Após 24, 48, 72 h em meio completo com SFB, as células de 3 frascos para cada tempo foram lavadas com PBS e incubadas com solução de tripsina /EDTA para bloqueio do cultivo. A tripsina foi inativada com meio completo e as células foram contadas como descritas acima.

A análise de morfologia celular das linhagens foi realizada rotineiramente utilizando o microscópio invertido. As culturas foram fotografadas periodicamente para os registros de morfologia celular.

O efeito da expressão elevada de *SPRR2E* na migração celular foi avaliado em células transfectadas e seus controles cultivados em triplicata, em placas de 24 poços (BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers – MIC, Franklin Lakes, NJ, USA) com diâmetro de 6,5 mm e 8 µm de porosidade. Foram adicionados aos insertos 1×10^4 células/300µL de meio MEM sem soro fetal bovino. No compartimento inferior ao inserto (poço da placa) foram adicionados 500µL de meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as placas foram incubadas por 8 h à 37°C e 5% CO₂. Após esse período, os insertos foram fixados com 0,4% de formaldeído à temperatura ambiente por 20 min e as células remanescentes que não migraram (presentes na superfície superior do inserto) foram retiradas com o auxílio de um cotonete. Em seguida, os insertos foram corados por 5 min com o corante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol/DAPI (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil), seguido de banho em água milli-Q e cinco campos da membrana selecionados casualmente foram fotografados em microscópio de fluorescência invertido (*Axiovert 40* - Carl Zeiss, São Paulo, SP, Brasil), no laboratório da Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP), utilizando o programa *Axiovision Release 4.8*. As células presentes na membrana foram contadas nas fotografias obtidas.

A invasividade de células com expressão elevada de *SPRR2E* foi quantificada em câmaras de invasão com Matrigel, contendo insertos de 6,5 mm de diâmetro e 8 µm de porosidade (BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers – MIC). As células foram inoculadas no inserto que, após 48 h a 37°C e 5% CO₂. . Da mesma forma que nas câmaras de migração, os insertos foram fixados com 0,4% de formaldeído a temperatura ambiente por 20 min e as células remanescentes que não invadiram o Matrigel (presentes na superfície superior do inserto) foram retiradas com o auxílio de um cotonete. Em seguida, os insertos foram corados por 5 min com o corante fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindol/DAPI (Uniscience), seguido de banho em água milli-Q e cinco campos da membrana selecionados casualmente foram fotografados em microscópio de fluorescência invertido. As células presentes na membrana foram contadas nas fotografias obtidas.

Tratamento da linhagem celular Hep-2 com peptídeo da anexina

As células Hep-2 foram tratadas com solução recém-preparada do peptídeo N-terminal Ac2-26 da anexina A1 (Ac-AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) (Raynal & Pollard, 1994) na concentração de 2 µM. A solução recém-preparada foi adicionada no início do experimento e nos momentos de substituição do meio de cultura.

As células foram semeadas em concentração de 5×10^4 /mL em meio MEM com 20% de soro fetal bovino, e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂. Após 24 h, quando as células haviam aderido ao substrato, o meio foi substituído por meio sem SFB para permitir sincronização do ciclo celular na fase G₀. Novamente, após 24 h, o meio foi substituído por meio completo, liberando as células de G₀. A esse meio foi adicionado o peptídeo Ac2-26.

O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente no microscópio invertido e, a cada três dias, o meio foi substituído. Após 6 e 72 h, as células foram coletadas com trizol e seu RNA foi extraído para consequente confecção do cDNA. Análise da expressão

gênica foi realizada no aparelho *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

Extração de RNA e obtenção do cDNA

O RNA das linhagens celulares FaDu, Hep2, UM-SCC-38, SCC-9, bem como de queratinócitos e de amostras tumorais, foram extraídos sequencialmente, utilizando protocolo estabelecido no laboratório. Para extração de RNA total, as amostras de tecidos sólidos foram pulverizadas em cadinhos com nitrogênio líquido. Em seguida, receberam 1mL de Trizol (Gibco), foram agitadas em vortex por 20 s e mantidas à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 300 uL de clorofórmio e o material foi homogeneizado, incubado por 3 min à temperatura ambiente e centrifugado a 14.000 rpm a 2°C por 25 min. No caso de linhagens celulares, o pellet obtido após centrifugação das culturas foi ressuspensionado em Trizol e seguiu o mesmo protocolo.

Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e recebeu 500uL de isopropanol gelado para precipitação do RNA. O material foi incubado por 10 min à temperatura ambiente e centrifugado durante 30 min a 14.000 rpm a 2°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA lavado com 1000uL de etanol 75% (diluído em água DEPC). O material foi submetido a mais uma centrifugação de 15 min a 14.000 rpm a 2°C e, após remoção do sobrenadante, foi mantido em temperatura ambiente para secagem do *pellet* por 30 min. O RNA foi ressuspensionado em 40uL de água DEPC, mantido em banho seco durante 15 min a 65°C e, em seguida, colocado rapidamente em gelo durante 5 min.

A qualidade e a concentração do RNA foram avaliadas em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000*, Wilmington, USA). As amostras foram diluídas para uma concentração final de 1ug/μL e tratadas com *DNAseI Amplification Grade* 1U/uL (Invitrogen).

O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Ao final da reação, as amostras foram mantidas em gelo e os cDNAs foram estocados em freezer -20°C .

PCR em tempo real

Para análise de expressão gênica, foram utilizados reagentes padronizados para PCR em tempo real (*TaqMan Universal PCR Master Mix*, Applied Biosystems), com sonda específica (*Taqman*, Applied Biosystems) e aparelho *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

As reações foram realizadas em triplicatas utilizando 10 a 20 ng de cDNA por reação, *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), $0,5\mu\text{l}$ da sonda específica para o gene de interesse e $3,5\mu\text{l}$ provenientes da água para completar o volume final da reação ($10\mu\text{l}$). As condições da reação foram 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min e 40 repetições de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. As leituras da fluorescência foram realizadas a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisadas pelo *Sequence Detection Software* (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação.

Com o objetivo de avaliar a eficiência dos iniciadores, foram realizadas reações com cinco diluições em série de quantidades conhecidas de cDNA das linhagens celulares e de tecidos de autópsia (esôfago e gengiva) para construção da curva-padrão. A partir dessa curva, foi calculada a equação da reta e obtido o valor do *slope*. O cálculo da eficiência dos iniciadores foi realizado s a fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

Para seleção do controle interno, foi utilizado o programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002) que avaliou a expressão de genes constitutivos (*ACTB*, *GAPDH*, *BCR*, *HPRT*) em um *pool* de amostras. Os genes com expressão mais estável foram o *ACTB*, no caso de linhagens celulares, e o gene *GAPDH* no caso de amostras de tumores primários.

Os dados resultantes da reação de PCR em tempo real foram analisados calculando-se as médias aritméticas de cada triplicata das amostras a partir dos valores de C_t (C_t ou *cycle threshold* é o ciclo no qual as amostras atingem o ponto de fluorescência detectado pelo equipamento). Posteriormente, foi calculado o ΔC_t a partir da diferença entre a média aritmética obtida para o gene de interesse e a média calculada para o gene de referência ou controle interno. Para calcular o $\Delta\Delta C_t$, foram escolhidas as amostras de cDNA de queratinócitos normais (no caso de linhagens) ou de margens cirúrgicas (no caso de amostras primárias) como calibrador, atribuindo o valor zero para essas amostras como resultado da subtração com seu próprio ΔC_t . Nas demais amostras, o resultado do $\Delta\Delta C_t$ foi calculado a partir das diferenças dos valores de ΔC_t de cada uma delas em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta\Delta C_t}$, ou seja, o $(\Delta\Delta C_t)^2$.

Para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 2 ($\log_2$). Foi considerado aumento ou diminuição significativa da expressão quando o valor apresentado na forma de $\log_2$ esteve acima ou abaixo de um.

Clonagem

Em função dos genes *SPRR* não possuírem estrutura resolvida por ressonância magnética ou raio X, foram selecionados dois membros dessa família para clonagem (*SPRR2E* e *SPRR4*) que serão utilizados em experimentos futuros de expressão heteróloga e purificação de proteínas. O gene *SPRR2E* foi escolhido em função de sua baixa expressão em amostras estudadas e pela disponibilidade de vetor de expressão específico para células de mamíferos contendo a sequência. O gene *SPRR4* foi escolhido por ser o menos estudado da família *SPRR*.

A etapa de clonagem envolveu vários passos:

- a) construção do DNA recombinante pela ligação *in vitro* dos fragmentos do cDNA-alvo a um vetor;
- b) transformação das células hospedeiras (*Escherichia coli*) com a introdução do vetor recombinante;
- c) cultivo de células transformadas em ágar sólido;
- d) seleção de colônias individuais e avaliação da presença do inserto por PCR (reação em cadeia da polimerase), eletroforese em gel de agarose ou sequenciamento de DNA;
- e) expansão das células contendo o DNA recombinante em cultura líquida;
- f) purificação do plasmídeo, amplificação e sequenciamento do fragmento para confirmação da presença de sequência do DNA de interesse.

Clonagem do gene SPRR2E em vetor pGEMT. Inicialmente, o vetor recombinante comercial pCMV6-AC (Origene) contendo o fragmento correspondente ao cDNA do gene *SPRR2E* foi utilizado como molde para amplificação do fragmento de interesse com os iniciadores:

Sense: 5'-CGCGGATCCTCTTATCAACAGCAGCAGTGC-3'

Anti-sense: 5'-CCGCTCGAGATTACTTGCTCTTGGGTGGAC-3'

Esses iniciadores foram desenhados utilizando a sequência disponível no banco de RefSeqs (NM_001024209.2) com a adição de sítios de restrição (*Bam*HI no oligonucleotídeo sense e *Xho*I no anti-sense) para garantir a clonagem direcional do fragmento de cDNA. Após várias reações de PCR para obtenção de uma maior quantidade do produto, os amplificados foram transferidos para tubos de 1,5 ml e receberam 3 µl de acetato de sódio (3 M) e 150 µl de etanol 100% (Merck). O cDNA foi precipitado por 30 min em temperatura -80°C. Após centrifugação de 20 min a 16.100 g, 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 µl de etanol 70%. Em seguida, foi centrifugado por 10 min a 16.100 g, 4°C, e o precipitado foi ressuspensionado em 20 µl de água ultra-pura (Invitrogen, São Paulo, SP. Brasil).

A clonagem dos amplificadores foi realizada em vetor pGEMT easy vector (Promega, Wisconsin, USA) (Figura 10), seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de ligação, foram misturados 1 µl do produto de PCR, na concentração de 50 ng/µl, 1 µl do vetor e 1 µl da enzima T4 ligase. Após incubação por 12 a 16 h a 4°C, as bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5α (50 µl) foram transformadas com 5 µl do produto por choque térmico durante 1 min a 42°C. Logo em seguida, 1 ml de meio Luria-Bertani ou LB foi adicionado e as bactérias foram incubadas por 1 h e meia a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm. Um total de 100 µl do material foi plaqueado em ágar/LB/ampicilina (50 µg/ml) e em seguida incubado por 12 a 16 h a 37°C.

As colônias de bactérias crescidas nas placas foram colocadas em 4 ml de meio LB contendo 2 µl/ml de ampicilina (50 µg/ml) e incubados por 12 a 16 h a 37°C, sob agitação de 200rpm. A cultura foi centrifugada por 1 min a 14.000 rpm e o sedimento utilizado para a purificação dos plasmídeos pelo uso do Kit Minipreps DNA Purification System (Invitrogen) com protocolo descrito pelo fabricante. Os plasmídeos foram em seguida submetidos a sequenciamento de DNA para confirmação da inserção do inserto no vetor.

Obtenção da sequência de cDNA do gene SPRR4 pela técnica de overlap. A sequência de cDNA do gene *SPRR4* foi obtida pela técnica de *overlap* em colaboração do Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara). Essa técnica baseia-se em reações de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos longos (Bryksin and Matsumura, 2010), combinados aos pares e com regiões de sobreposição (Figura 11). Em cada etapa de amplificação, o produto foi purificado e utilizado para uma subsequente PCR. As reações de amplificação seguiram o protocolo tradicional, com um mix contendo dNTPs e enzima, mas sem oligonucleotídeos e DNA.

As condições para amplificação foram: 1 ciclo de 94°C (2 min), 35 ciclos de 94°C (45 s), seguidos por um ciclo de 35°C (1 min e 45 s), 72°C (2 min e 45 s) e 1 ciclo de 4°C ∞.

Figura 10: Mapa físico do vetor de clonagem pGEM®T, com suas regiões de múltipla clonagem

Os fragmentos amplificados foram avaliados em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) ou TBE (Tris- Borato-EDTA), preparado em forno microondas. O material foi aplicado no gel após a adição de solução de xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%. A eletroforese foi realizada a 80 volts e o gel foi corado com brometo de etídio (concentração final 0,5µg/ml) e visualizado sob UV.

Clonagem do gene SPRR4 em vetor pGEMT. As etapas para clonagem no vetor pGEMT easy vector (Promega) foram as mesmas citadas anteriormente para o gene *SPRR2E*.

Sequenciamento de DNA

Para confirmação da presença do fragmento de interesse no vetor, foi realizado o seqüenciamento direto com os iniciadores genéricos do kit e os iniciadores específicos para os genes *SPRR4* e *SPRR2E*, utilizando o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (Applied Biosystems) e as recomendações do fabricante. Para a reação de PCR, foram adicionados os iniciadores genéricos (3,2 µM) e os específicos (3,2 µM), o DNA recombinante (200 ng), 4 µl de tampão de reação contendo os desoxinucleotídeos e os didesoxinucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP e a enzima, e água para volume final de 20µl. As reações foram processadas em termociclador automático (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), programado para realizar 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 50°C por 15 s e síntese a 60°C por quatro min.

O produto da reação foi precipitado e reconstituído em 20 ul formamida *high dye* (pH 7,0). Após ser submetido à etapa de choque térmico a 95°C por dois min para quebra de estruturas secundárias que possam impedir a correta separação dos fragmentos marcados, o DNA reconstituído em formamida foi transferido para as placas do sequenciador automático (ABI 3130 Genetic Analyzer, Applied Biossystem) e submetido à eletroforese em capilar.

240 bp

A eletroforese foi realizada durante aproximadamente uma hora e meia. Nessa etapa, os fragmentos de DNA marcados foram separados de acordo com seus tamanhos (diferença de um nucleotídeo entre cada fragmento), detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda, e interpretados pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao passarem pela região de leitura ótica do sequenciador.

Análise Estatística

As análises estatísticas utilizaram:

- (a) teste t de Student não-pareado para resultados de expressão gênica, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com);
- (b) análise de variância (univariada) para medidas repetidas em ensaios de curva de crescimento;
- (c) teste t , teste não-paramétrico de Mann-Whitney e teste Anova para ensaios de migração e invasão.

As análises estatísticas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Ferrari (IBILCE, São José do Rio Preto, UNESP).

Casuística

Foram analisados 19 pares de tumor-margem de carcinoma de laringe (8 N0 e 11 N+), 8 pares de carcinoma de língua (4 N0 e 4 N+) e 17 de soalho de boca (10 N0 e 7 N+). Essas amostras foram procedentes de 44 pacientes, 39 (88,6%) do sexo masculino e 5 (11,4%) do sexo feminino, com idades variando entre 39 e 79 anos (média = 56,20 anos); 42 (95,5%) eram fumantes ou foram fumantes no passado e 41 (93,2%) faziam uso abusivo de álcool ou já haviam feito no passado. A classe TNM e o estágio mais frequentes dos tumores foram T4N0M0 e IV, respectivamente. Em relação às características histopatológicas, a maior porcentagem de casos mostrou diferenciação histológica moderada, ausência de infiltração vascular sanguínea e linfática, presença de invasão perineural e infiltrado inflamatório peritumoral escasso. Um total de 12 pacientes foi a óbito pela neoplasia e 4 por outras causas (Tabela 5).

Análise filogenética dos genes *SPRRs*

A árvore filogenética realizada pelo método de *Neighbor-joining* no programa MEGA mostrou que os genes *SPRR* estão separados em dois clados principais (Figura 12): os *SPRR2s* e o *SPRR4*, enquanto os *SPRR1* (*SPRR1A* e *SPRR1B*) e os *SPRR3* (*SPRR3-1* e *SPRR3-2*) em um segundo clado. Os valores de *bootstrap* dados pelo programa superiores a 50% indicam similaridade de sequência.

Duas variantes geradas por *splicing* alternativo são conhecidas para os genes *SPRR*, mas nenhuma informação sobre função diferencial é conhecida.. O transcrito da isoforma 2 de *SPRR1A* possui um sítio 5' alternativo no exon da região 3'UTR enquanto a isoforma 2 de *SPRR3* perde um exon alternativo. Apesar de possuírem transcritos menores que a isoforma 1, as proteínas variantes são idênticas às variantes maiores.

O *SPRR2C* é referido no *NCBI* como sendo pseudogene não processado.

Tabela 5. Frequência dos parâmetros sexo, idade, exposição a fumo e álcool, sítio primário, TNM, estágio e características histopatológicas de 47 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes (%)
Sexo	Masculino	39 (88,63%)
	Feminino	5 (11,36%)
Idade*	≥ 40	43 (97,72%)
	< 40	1 (2,27%)
Fumante	Sim	33 (75,00%)
	No passado	9 (20,45%)
	Não	2 (4,54%)
Etilista	Sim	29 (65,90%)
	No Passado	12 (27,27%)
	Não	3 (6,81%)
Sítio Primário	Língua (C02)	8 (18,18%)
	Soalho de boca (C04)	18 (40,90%)
	Laringe (C32)	21 (47,72%)
Classificação	T1	2 (4,54%)
	T2	11 (2,27%)
	T3	10 (22,72%)
	T4	21 (47,72%)
	N0	22 (50,00%)
	N1	4 (9,09%)
	N2	14 (31,81%)
	N3	4 (9,09%)
	M0	38 (86,36%)
Estádio	M1-X	6 (13,63%)
	I	0 (0%)
	II	4 (9,09%)
	III	12 (27,27%)
	IV	22 (50,00%)
	Sem informações	6 (13,63%)
Diferenciação Histológica	Pouco diferenciado	4 (9,09%)
	Moderada	24 (54,54%)
	Bem diferenciado	16 (36,36%)
Infiltração Vascular Sanguínea	Presente	5 (11,36%)
	Ausente	39 (88,63%)
Infiltração Linfática	Presente	9 (20,45%)
	Ausente	36 (81,81%)
Invasão Perineural	Presente	26 (59,09%)
	Ausente	18 (40,90%)
Infiltrado Inflamatório Peritumoral	Escasso	19 (43,18%)
	Moderado	17 (38,63%)
	Intenso	4 (9,09%)
	Sem informações	4 (9,09%)
Óbito	Não	27 (61,36%)
	Pela neoplasia	12 (27,27%)
	Outras causas	4 (9,09%)
	Sem informações	1 (2,27%)

* Idade média do grupo = 56,20 anos

Figura 12: Relações filogenéticas inferidas entre os genes *SPRRs* pelo método de *neighbor-joining*. Os números nos ramos representam os valores de distância evolutiva encontrados.

Integridade do RNA de linhagens celulares e tumores primários

A extração dos RNAs de todas as linhagens celulares (UM-SCC-38, SCC9, Hep-2 e FaDu) nos tempos 24, 48 e 72hs de cultivo foi realizada com sucesso. Sua integridade foi confirmada por eletroforese com gel de agarose 2%, como pode ser observada pela presença das bandas ribossômicas 18S e 28S nesses géis (Figura 13). Suas concentrações ficaram entre 1448,39ng/ μ L e 4269,67ng/ μ L.

O RNA de amostras de tumor e suas respectivas margens mostrou concentração média de 1562,7ng/ μ L e 981,2ng/ μ L, respectivamente (valores entre 108,10ng/ μ L a 3575,67ng/ μ L) (Figura 14)

Figura 13: Fotografia de géis de agarose 2% após eletroforese de RNA das linhagens UM-SCC-38, SCC-9, Hep-2 e FaDu nos tempos 24, 48 e 72hs de cultivo.

Figura 14: Fotografia de gel de agarose 2% após eletroforese de RNA dos tumores e suas respectivas margens. **T** = amostra de tumor; **M** = amostra de margem.

Curvas-Padrão

As curvas-padrão, elaboradas a partir de diluições seriadas de cDNA (cDNA puro e diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), foram realizadas em triplicatas de amostras de autópsia de esôfago (para os genes *SPRR1A*, *SPRR1B*, *SPRR2A* e *SPRR2D*), de gengiva (para os genes *SPRR2B*, *SPRR2C*, *SPRR2E*, *SPRR2F*, *SPRR2* e *SPRR3*) e da linhagem celular de queratinócitos normais (para o gene *SPRR4*). Foram consideradas curvas-padrão satisfatórias aquelas com *slope* entre -3,1 e -3,9 (ideal -3,32). A Figura 15 mostra, como exemplos, as curva-padrão para os genes *SPRR3* e *SPRR2F*.

Figura 15: Curvas-padrão para os genes *SPRR3*(A) e *SPRR2F*(B).

Expressão dos genes *SPRRs* em linhagens celulares

De acordo com os dados obtidos pelo programa GeNorm, o gene *ACTB* foi utilizado como controle constitutivo para quantificação relativa dos genes *SPRR1A*, *SPRR1B*, *SPRR2A*, *SPRR2B*, *SPRR2C*, *SPRR2D*, *SPRR2E*, *SPRR2F*, *SPRR2G*, *SPRR3* e *SPRR4* nas linhagens celulares UM-SCC-38, SCC-9, Hep-2 e FaDu, utilizando queratinócitos bucais humanos normais como calibrador.

Os resultados mostraram ausência ou baixa expressão dos genes de interesse em todas ou na maioria das linhagens celulares, com exceção do gene *SPRR4*, que exibiu níveis mais elevados nas células UM-SCC-38 após cultivo de 24 e 48 h (Figura 16).

Expressão dos genes *SPRRs* em tumores primários

A expressão dos 11 genes de interesse foi avaliada em 19 pares de tumores e margens cirúrgicas de laringe (8 N0 e 11 N+), 8 pares de tumores e margens cirúrgicas de língua (4 casos de N0 e 4 N+), e 17 pares de tumores e margens cirúrgicas de soalho de boca (10 N0 e 7 N+). Os resultados mostraram heterogeneidade de expressão de um mesmo gene em diferentes sítios, embora o padrão observado em laringe e soalho de boca tenha sido bastante similar para a maioria dos *SPRRs*. Os carcinomas de língua mostraram geralmente redução de expressão de *SPRRs*, mas esse dado deve ser interpretado com cautela considerando o número pequeno de amostras do grupo.

Os dados de *SPRR4* não foram conclusivos em função do número pequeno de amostras exibindo presença de seus transcritos em todos os sítios.

A análise dos dados pelo teste *t*- não pareado não mostrou diferença significativa de expressão dos genes *SPRRs* entre os grupos N+ e N0 ou independentemente do sítio anatômico (Figura 17). Quando a análise foi realizada sem considerar os grupos N+ e N0, foi observada uma diferença significativa de expressão entre língua e laringe ou soalho de boca para todos os genes, exceto *SPRR4* (Figura 18). Novamente, esse resultado deve ser

interpretado com cautela em função do número pequeno de amostras de carcinomas de língua. Na comparação laringe versus soalho de boca, não foram observadas diferenças significativas.

Os genes *SPRR1B* e *SPRR2s* mostraram expressão elevada consistente nos tumores de laringe e na maioria dos tumores de soalho de boca e enquanto o *SPRR3* apresentou redução de transcritos nesses grupos, evidenciando a semelhança entre eles citada acima.

Os valores estatísticos referentes à análise por PCR em tempo real da expressão dos genes *SPRRs*, na comparação dos sítios anatômicos (língua, laringe e soalho de boca) e entre os grupos N0 e N+, estão apresentados na tabela do anexo (página 91).

Figura 16. Valores da expressão relativa em logaritmo de base 2 referentes à análise por PCR em tempo real dos genes *SPRRs* nas linhagens celulares UMSCC38, HEP-2, SCC9 e FADU, utilizando o gene *ACTB* como controle constitutivo e queratinócitos bucais humanos normais como calibrador.

Figura 18: Valores da expressão relativa em logaritmo de base 2 referentes à análise por PCR em tempo real dos genes *SPRRs*, na comparação dos sítio anatômico (língua, laringe e soalho de boca). Os dados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0.05$ (*). As barras de erros representam média $\pm$ S.E.M (desvio padrão). LI=língua, LA=laringe, SA=soalho de boca.

Indução da expressão gênica

Durante o experimento para indução da expressão estável do gene *SPRR2E* na linhagem celular Hep-2, foi observada morte celular das células controles (Figura 19b), evidenciada pela mudança da morfologia epitelioide (Figura 19a) para esférica e perda da aderência à superfície. Esse resultado era esperado em função das condições de cultura, ou seja, em presença do antibiótico geneticina utilizado para seleção positiva das células transfectadas. Após 7 dias cultivo, apenas as células transfectadas permaneciam vivas (Figura 19c e 19d) e passaram a exibir uma morfologia fibroblastóide (Figura 19d).

Após 20 dias de transfecção, foi extraído o RNA e as reações de amplificação por PCR confirmaram a indução de expressão de *SPRR2E*, cujo nível de transcritos aumentou 1,7 vezes (Figura 20).

Índice de proliferação

O efeito da expressão ectópica do gene *SPRR2E* na proliferação de células epiteliais neoplásicas foi avaliado por meio de curva de proliferação. As células Hep-2 foram cultivadas em uma concentração inicial de 1×10^4 células e contadas após 24, 48 e 72 h, a partir de um período de 24 h em meio de cultura sem soro para sincronização do ciclo celular na fase G_0 . O gráfico resultante da contagem em triplicatas é apresentado na Figura 21, que mostra uma pequena redução nas células transfectadas após 48 horas. Entretanto, a análise de variância (univariada) para medidas repetidas não mostrou efeito significativo ($p = 1\%$) da expressão ectópica do gene *SPRR2E* na proliferação celular.

Figura 19: Fotografias em microscópio óptico invertido de (A) células Hep-2 controle no início do experimento; (B) células Hep-2 controle após 7 dias de cultivo em presença do antibiótico geneticina; (C) células Hep-2 controle transfectadas com o vetor vazio, após 7 dias de cultivo na presença do antibiótico geneticina; (D) células Hep-2 transfectadas com sequência do gene *SPRR2E*, após 7 dias de cultivo.

Figura 20: Gráfico com os valores de Log2 do ensaio de indução de expressão após 20 dias. O nível dos transcritos do gene *SPRR2E* aumentou 1,7 vezes em relação aos controles.

CURVA DE PROLIFERAÇÃO

Figura 21: Curva de proliferação de células Hep-2 controle (linha preta), transfectadas com o vetor vazio (linha vermelha) e transfectadas com sequência do gene *SPRR2E* (linha verde).

Ensaio de migração e invasão

Para entender o papel da expressão ectópica do gene *SPRR2E* na migração e na invasão de células epiteliais neoplásicas, foram realizados ensaios em triplicatas utilizando um vetor com a sequência codificadora desse gene. O número médio de células que migraram pelos poros da membrana mostrou uma pequena redução no caso de células transfectadas com o gene em relação às células controles ou com o vetor vazio (Figura 22). A análise pelo teste *t* e pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney não acusou diferença significativa entre os dados dessas duas últimas ($p > 0,05$). A análise pelo teste Anova comparando as células transfectadas com vetor vazio ou vetor cheio e as células controle também não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$). Na Figura 23, é apresentado o gráfico do teste de migração, indicando as médias dos números de células ($\times 10^4$) das triplicatas para os três grupos.

No ensaio de invasão, o número de células com expressão ectópica de *SPRR2E* que invadiram a membrana de Matrigel mostrou diferença significativa em relação às células controle ou com vetor vazio (teste Anova, $p = 0,008$), mas sem diferença entre as duas últimas ($p > 0,05$) (Figura 24). Na Figura 25, é apresentado o gráfico com os resultados desse ensaio.

Figura 22: Fotografia em microscópio de fluorescência de insertos de câmara de migração após 8 horas de cultivo. (A) Células Hep-2 controle; (B) células Hep-2 transfectadas com o vetor vazio; (C) células Hep-2 transfectadas com sequência do gene *SPRR2E*.

Figura 23: Gráfico do teste de migração, indicando as médias do número de células ($\times 10^4$) das triplicatas de controles, transfectadas com o vetor vazio e com a sequência do gene *SPRR2E*.

Figura 24: Fotografia em microscópio de fluorescência de insertos de câmara de invasão após 8 horas de cultivo. (A) células Hep-2 controle; (B) células Hep-2 transfectadas com o vetor vazio; (C) células Hep-2 transfectadas com sequência do gene *SPRR2E*.

Figura 25: Gráfico do teste de invasão, indicando as médias do número de células ($\times 10^4$) das triplicatas de controles, transfectadas com o vetor vazio e com a sequência do gene *SPRR2E*.

Tratamento da linhagem celular Hep-2 com Anexina

Para avaliar o efeito de um composto anti-inflamatório na expressão dos genes *SPRRs*, as células Hep-2 foram tratadas com o peptídeo da anexina A1.

Foi observada uma redução na expressão de todas as *SPRRs*, especialmente depois de 72hs de tratamento, exceto para os genes *SPRR2B*, *SPRR2C*, *SPRR3* e *SPRR4* (Figura 26).

Figura 26: Gráfico com os valores de LOG 2 do ensaio com tratamento com anexina, nos tempos de 6 e 72hs.

Clonagem dos genes *SPRR2E* e *SPRR4*

SPRR2E. A região codificadora do gene *SPRR2E* (240pb) foi amplificada com sucesso (Figura 27). Após várias PCRs para obtenção de uma maior quantidade do amplificado, o produto foi subclonado no vetor pGEMT, que foi seqüenciado para confirmação da presença do inserto (Figura 28).

SPRR4. Para clonagem do cDNA do gene *SPRR4*, foi utilizada a técnica de PCR *overlap*, com a utilização de sete oligonucleotídeos combinados aos pares e com regiões de sobreposição. Os amplificadores obtidos de cada par sobreposto foram purificados e utilizados para uma subsequente PCR *overlap*.

Para obtenção do cDNA, os oligonucleotídeos e os amplificadores intermediários foram combinados em PCRs conforme o Esquema 1. A Figura 29 mostra fotografias de géis de agarose 2% após eletroforese dos produtos de PCRs.

1ª PCR	oligonucleotídeos P1 e P2	tamanho esperado do produto 90 pb
2ª PCR	oligonucleotídeos P3 e P4	tamanho esperado do produto 87 pb
3ª PCR	oligonucleotídeos P5 e P6	tamanho esperado do produto 84 pb
4ª PCR	amplificados P1/P2 e P3/P4	tamanho esperado do produto 162 pb
5ª PCR	amplificados P1/P4 e P5/P6	tamanho esperado do produto 231 pb
6ª PCR	amplificados P1/P6 e P7	tamanho esperado do produto 290 pb

Esquema 1. Sequência de PCRs para obtenção do *overlap*

O seqüenciamento do produto final do ensaio de *overlap* confirmou o sucesso da abordagem. Após várias PCRs para obtenção de uma maior quantidade do amplificado, o produto foi subclonado no vetor pGEMT, que também foi seqüenciado para confirmação da presença do inserto (Figura 30).

Figura 29: Fotografia de géis de agarose 2% após eletroforese dos produtos de PCR para obtenção do fragmento *overlap*. **(A)** União dos pares de oligonucleotídeos P1/P2, P3/P4 e P5/P6, com tamanhos esperados de 90 pb, 87 pb e 84 pb, respectivamente. **(B)** União dos pares de oligonucleotídeos P1-P6, P5-P7 e P1-P4, com tamanhos esperados de 231 pb, 109 pb e 162 pb, respectivamente (setas). **(C)** União de todos os oligonucleotídeos e finalização do *overlap*, com obtenção da banda de 290 pb.

Figura 30: Resultado de sequenciamento do fragmento clonado referente ao gene *SPRR4*. **(A)** Cromatograma; **(B)** Resultado de busca realizada no banco de seqüências do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

O objetivo do presente trabalho foi investigar a participação das proteínas pequenas ricas em prolina, SPRs, no desenvolvimento dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e no fenótipo da célula neoplásica. Para alcançar tal propósito, vários métodos foram utilizados para estudar linhagens celulares de diferentes sub-sítios anatômicos de cabeça e pescoço e amostras de CECP, tanto para caracterizar os genes e as proteínas de interesse como para avaliar seu perfil de expressão e sua participação na biologia desses carcinomas.

Em relação à casuística, foi observado que praticamente 90% dos pacientes eram do sexo masculino, quase todos acima de 40 anos, o que fala a favor de fatores etiológicos comuns. Realmente, a maioria deles era ou foi fumante e/ou etilista e apenas três deles nunca fizeram uso de fumo ou álcool. O maior consumo de álcool e tabaco pelo sexo masculino explica também o número elevado de homens na amostra.

Esses dados estão de acordo com os inúmeros trabalhos da literatura mostrando que o tabaco e o álcool são os fatores etiológicos mais importantes de CECP (Peterson, 2009; Hashibe et al., 2009; Ferlay et al., 2010; Saman, 2012) e aumentam o risco para os fumantes na ordem de três a quatro vezes para câncer da cavidade oral e faringe e dez vezes para câncer de laringe (Vineis et al., 2004). Para etilistas, o aumento também é significativo: o consumo de 50 gramas por dia traduz-se no aumento de aproximadamente três vezes o risco de câncer de cavidade oral e faringe e cerca de duas vezes o risco de câncer de laringe.

Juntos, tabaco e álcool são responsáveis por aproximadamente 83% dos tumores de cabeça e pescoço na América Latina (Hashibe et al., 2009). Em sua revisão, Saman (2012) apresenta dados de estudos epidemiológicos mostrando que o impacto do efeito combinado dos dois fatores é maior que a soma dos seus efeitos individuais. Por exemplo, Rodriguez et al. (2004) referem *odds ratios* (razão de probabilidades) de 20,7 para fumantes, 4,9 para etilistas e 48 para fumantes e etilistas.

A idade média relativamente alta dos pacientes estudados (cerca de 55 anos) também está de acordo com o esperado quando os fatores etiológicos principais são

tabaco e álcool porque seus efeitos no DNA acumulam-se com a idade. As nitrosaminas da fumaça do cigarro, por exemplo, são carcinógenos importantes que deixam marcas no material genético na forma de mutações específicas em oncogenes e genes supressores de tumor (Hecht et al., 2008).

No gene *TP53*, a frequência das transversões GC → TA, principalmente nos códons 280 e 281, aumenta significativamente com o tempo de exposição (revisto por Lea et al., 2007). No caso das bebidas alcoólicas, seu principal constituinte, o etanol, não é considerado um carcinógeno, mas seu metabólito acetaldeído é mutagênico e possui um papel fundamental na carcinogênese. Os seus principais danos incluem interferência na síntese de DNA, indução de trocas entre cromátides irmãs, mutações, inibição de enzimas de reparo, ligação a proteínas e ao DNA resultando em alterações da morfologia e da fisiologia celular (revisto por Reidy et al., 2011). Portanto, não é difícil concluir que o risco aumenta com a idade do usuário.

Um dos pacientes que nunca bebeu ou fumou é o mais jovem da amostra (39 anos), o que sugere um fator etiológico diferente dos demais. Recentemente, a infecção por papilomavírus (HPV) do tipo 16 foi identificada como responsável por uma fração significativa de CECPs em pacientes abaixo dos 50 anos, em especial os de orofaringe (IARC, 2007). No estudo de Herrero e colaboradores (2003), a prevalência de DNA de HPV em amostras de cavidade bucal e de orofaringe foi de 3,9% e 18,3%, respectivamente. No estudo de Smith et al. (2007), anticorpos anti-HPV 16 E6/E7 foram associados a um risco cinco vezes maior de câncer da cavidade oral e 70 vezes maior de câncer da orofaringe.

Aparentemente, os tumores HPV positivos formam um grupo distinto em CECP: o perfil molecular é específico, em geral sem mutações no *TP53* e com expressão de p16, são pouco diferenciados e, embora frequentemente exibam comprometimento linfonodal e doença em estágio avançado ao diagnóstico, possuem prognóstico mais favorável em relação aos demais CECPs (Syrjänen, 2010; Marur et al., 2010; Leemans et al., 2011).

O grupo de tumores estudados foi artificialmente selecionado para apresentar igual número de casos com presença (N+) ou ausência (N0) de metástases em linfonodos regionais. Entre eles, a maior parte compreendeu tumores de estágio IV, extensos, bem ou moderadamente diferenciados, sem infiltração vascular ou linfática e sem metástases à distância, mas com infiltrado inflamatório peritumoral e perineural. Dentre essas características, o comprometimento linfonodal representa um dos mais importantes fatores prognósticos e um achado crítico para o delineamento do tratamento dos pacientes (Pantel & Brakenhoff, 2004). Tal tratamento inclui o esvaziamento cervical nos casos N+, um procedimento cirúrgico seguro que reduz significativamente o risco de recorrência regional, porém resulta em aumento de morbidade (Kowalski & Sanabria, 2007).

Apesar da seleção artificial do grupo de amostras, os dados confirmaram o que é geralmente observado, ou seja, a maioria dos CECPs apresenta metástase linfonodais e poucas metástases à distância. Essa característica deve ser decorrente das particularidades do sítio anatômico e de seu microambiente, incluindo densidade de vasos linfáticos e secreção de fatores linfangiogênicos, que podem influenciar as rotas de disseminação (De Wever & Mareel, 2003; Sedivy et al., 2003; He et al., 2005). Entretanto, para invadir os vasos adjacentes, as células precisam alterar sua plasticidade, de um fenótipo epitelial para um fenótipo mais mesenquimal, reduzir adesão a células vizinhas, remodelar seu citoesqueleto e aumentar as propriedades migratórias. Além disso, seu sucesso em repovoar outros nichos depende de sua capacidade de sobreviver na corrente sanguínea, extravasar e proliferar em linfonodos ou outros tecidos (Chung et al., 2006; Thiery et al., 2002).

Para atingir o estágio metastático, a célula de CECP deve alterar sua morfologia e, primordialmente, a composição e os níveis de suas proteínas e outras moléculas.

Na tentativa de contribuir para o entendimento da tumorigênese de cabeça e pescoço, foi estudada uma família de genes codificadores de proteínas precursoras da camada córnea que, em análises anteriores do nosso grupo, mostraram níveis baixos de

transcritos e proteínas de alguns de seus membros (*SPRR2F*, *SPRR2E* e *SPRR3*) (Silveira et al., 2008; Polachini et al., submetido).

Inicialmente, foi investigada a história evolutiva dessa família de genes e construída a árvore filogenética por análise de agrupamento (*neighbor-joining*), com base nas sequências de transcritos. Um trabalho da literatura apresenta o diagrama hipotético sobre a evolução dos genes *SPRR1*, *SPRR2*, *SPRR3*, *involucrina* e *loricrina*, comparando os domínios N- e C-terminais conservados (Gibbs et al., 1993). Os nossos resultados utilizando apenas as sequências de *SPRRs* mostraram um grupo bastante similar (*SPRR2A*, *B*, *D*, *E*, *F* e pseudogene *SPRR2C*), com provavelmente dois membros ancestrais (*SPRR2G* e *SPRR4*). Um segundo grupo com maior heterogeneidade compreendeu os genes *SPRR3* e *SPRR1*. Esse agrupamento segue aquele descrito por Cabral et al., (2001) que utilizou a similaridade dos N- e C-terminais e das repetições da região central da proteína.

O gene *SPRR4* mostrou-se diferente dos demais na análise filogenética, provavelmente em função de sua sequência maior que dos demais, o que dificultou um pareamento satisfatório. No banco de dados do NCBI, todos os *SPRRs* possuem sequências de referência validadas, exceto o *SPRR4*, cujo status consta como “provisório”, ou seja, “não curado”, e portanto com sequência fornecida automaticamente tendo como base outros dados do banco. Isso pode ter influenciado o resultado da árvore filogenética e da ancestralidade do gene, que deve ser considerado com cautela.

A análise da expressão dos *SPRRs* mostrou ausência ou níveis baixos de transcritos em todas ou na maioria das linhagens celulares, com exceção do *SPRR4* nas células UM-SCC-38. Esses achados são similares aos de Lohman e colaboradores (1997b), que observaram níveis reduzidos de *SPRR3*, *SPRR1* e *SPRR2* em linhagens de queratinócitos derivadas de carcinoma epidermóide de língua. Como já referido por Rheinwald e Beckett em 1980, as linhagens de CECF possuem seu mecanismo de diferenciação terminal e de formação do envelope córneo alterado, o que pode explicar o resultado obtido no presente trabalho. Vários estudos mostram a importância do Ca^{+2}

nesse processo, com elevação de níveis de transcritos após a adição de cálcio no meio de cultura (Steinert & Marckov, 1995; Yaar et al., 1995; Lohman et al., 1997a/b; Kalinin et al., 2001; Cabral et al., 2001).

O trabalho de Lohman e colaboradores (1997b) sugere que a expressão dos genes *SPRRs* em linhagens é dependente do tipo celular e da extensão do defeito na diferenciação terminal. De fato, Yaar e colaboradores (1995) observaram diferenças na expressão de SPR-1 entre células em distintas etapas da diferenciação, o que reforça a hipótese dessas proteínas serem um marcador de diferenciação terminal e, portanto, ter potencial diagnóstico.

Em relação aos tumores primários, os resultados de expressão gênica foram consistentes nos casos de laringe e soalho de boca, que contavam com maior número de amostras, e algumas inferências podem ser feitas a partir desses dados. Poucos genes exibiram diferenças entre os grupos N+ e N0 de cada sub-sítio. Quando não foi considerado o sub-sítio, apenas os transcritos de *SPRR2E* e *2F* mostraram diferenças entre os grupos N+ e N0, mas não significativas. Portanto, a expressão dos genes *SPRRs* não está associada à presença de metástase linfonodal nos casos estudados.

Levando em conta apenas os sub-sítios de laringe e soalho de boca, foram observados níveis elevados de transcritos da maioria dos genes na comparação dos tumores com suas respectivas margens cirúrgicas, exceto o *SPRR3* que mostrou redução significativa de expressão. Os resultados mais marcantes ocorreram para os transcritos de *SPRR2B*, *SPRR2E* e *SPRR2G* em carcinomas de laringe.

Esses achados confirmaram parcialmente os dados de Silveira e colaboradores (2008) e Polachini e colaboradores (comunicação pessoal), que também observaram baixos níveis de transcritos e proteínas codificados por *SPRR3* pela técnica de SAGE ou por abordagens proteômicas, respectivamente. Da mesma forma, de Simão e colaboradores (2011) detectaram expressão reduzida de *SPRR3* em pacientes com CECP associada ao consumo de bebida alcoólica, e sugeriram que esse gene é regulado não somente por fatores envolvidos na diferenciação do epitélio como também por

fatores ambientais. Trabalhos anteriores (Simanowski et al., 1986, 1993, 1995; Homann et al., 1997) já haviam notado a associação do álcool com proliferação e diferenciação celular, e com espessamento da camada basal de mucosas.

Yaar e colaboradores (1995) observaram um efeito da idade na expressão de *SPRR1*, com aumento em pele de recém-nascidos e redução em adultos. Outro dado interessante obtido por esses pesquisadores foi na elevação de expressão de *SPRR1* em células neoplásicas próximas a infiltrado inflamatório, o que poderia ser modulado parcialmente pela liberação de citocinas. Isto foi confirmado *in vitro* pela adição das interleucinas IL-3 e IL-1- α ao meio de cultura. A associação de expressão desses genes com inflamação foi também referido por de Heller-Milev e colaboradores (2000) em seu estudo de neoplasias de pele e dermatoses inflamatórias, incluindo psoríase e líquen plano. Esses autores notaram que a intensidade da imunomarcagem de *SPRR1* e *SPRR2* foi correlacionada com grau de hiperplasia e com densidade de inflamação e que a expressão de *SPRR3* foi elevada apenas nos tumores.

A psoríase é uma doença inflamatória de pele caracterizada por lesões róseas ou avermelhadas, cuja resposta imune predominante é a produção de citocinas (como interleucina-12 e interferon- γ) e a infiltração de neutrófilos (revisto por Hoffjan e Stemmler, 2007). Portanto, aparentemente existe uma relação direta ou indireta de interleucinas com algumas SPRs. Essa hipótese é apoiada por dados de outras doenças inflamatórias, como o tracoma.

O tracoma é uma doença oftálmica iniciada por infecções recorrentes da conjuntiva que induzem resposta inflamatória crônica, acúmulo de tecido cicatricial e opacificação da córnea. Burton e colaboradores (2011) observaram expressão elevada de *SPRR1A*, *SPRR2A*, *SPRR2D* e *SPRR2F* nos estágios tardios do tracoma, com metaplasia escamosa e consistente inflamação da conjuntiva. A metaplasia escamosa da conjuntiva ocorre em outras condições, como a doença do olho seco, que também mostra expressão elevada de SPRs (1 e 2) e de citocinas pró-inflamatórias, particularmente de IL-1 β e interferon- γ (de Paiva et al., 2007) Li et al., 2008).

Em modelos animais de asma, a mesma associação inflamação-SPRs foi referida por Finkelman e colaboradores (2005) na análise dos efeitos da interleucina IL-13 em pulmão e detectaram uma elevação consistente da expressão dos genes *SPRR1A*, *SPRR2A* e *SPRR2B*.

Esses dados concordam com os achados do presente trabalho, particularmente em CECF de laringe que apresenta um componente inflamatório importante. Um microambiente com acúmulo de células do sistema imune e fatores pró- e anti-inflamatórios deve favorecer a síntese de proteínas SPRs. Nesse contexto, é coerente o achado inédito do presente trabalho de inibição da maioria dos *SPRRs* pelo pepetídeo N-terminal Ac2-26 do anti-inflamatório natural anexina A1. Essa proteína é regulada por esteróides e relacionada com os efeitos benéficos dos glicocorticóides, como inibição de proliferação e regulação de diferenciação celular (Flower & Rothwell, 1994). Em trabalhos anteriores do grupo (Lisoni et al., 2006), o peptídeo da anexina A1 induziu a expressão de uma proteína transmembrânica acoplada à proteína G, a CCR10, que é receptor para a quimiocina CCL27 envolvida em imunidade de mucosa.

Um fator exógeno reconhecidamente relacionado com inflamação é o tabaco. Os constituintes da fumaça do cigarro, em especial as espécies reativas de oxigênio, ativam cascatas de sinalização intracelulares e levam à ativação de genes do processo inflamatório e secreção de interleucinas, promovendo recrutamento crônico de células do sistema imune. Esse processo é particularmente evidente na mucosa de fumantes e tem sido associado a doenças orais e tumores de cabeça e pescoço (revisto por Lee et al., 2012)

O uso do tabaco pode, portanto, estar relacionado com a expressão das *SPRRs* nos tumores de laringe e soalho de boca estudados (75% de fumantes ao diagnóstico). Grando e colaboradores (1996) observaram que queratinócitos cultivados em presença de nicotina por longos períodos de tempo exibiram níveis elevados de proteínas envolvidas na diferenciação terminal, incluindo queratina 10, transglutaminase 1, involucrina e filagrina. Este achado pode ser explicado pela estimulação colinérgica da

nicotina, que induz a entrada de Ca^{+2} nos queratinócitos e estimula a diferenciação. Em camundongos expostos à fumaça de cigarro, Tesfaigzi e colaboradores (1996a) também detectaram aumento da expressão de *SPRR1*, reforçando o envolvimento do tabaco na alteração dos componentes do envelope córneo.

A explicação para as diferenças de expressão entre linhagens celulares versus tumores primários, entre os três sub-sítios anatômicos ou entre os genes *SPRRs* não é simples porque ainda faltam dados sobre as funções específicas que as proteínas desempenham nas células normais e neoplásicas. Entretanto, apesar das limitações, algumas considerações podem ser feitas.

A proteína SPR-2A, por exemplo, além de conferir integridade estrutural para o envelope corneificado de epitélios estratificados, parece ser crítica como modulador de processos de cicatrização, permitindo a aquisição de características mesenquimais (transição epitélio-mesenquimal/EMT) e, ao mesmo tempo, quelando espécies reativas de oxigênio. A proteína p53, ao contrário, induz bloqueio do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e inibe EMT. Mizuguchi e colaboradores (2012) mostraram que a SPR-2A funciona como um supressor da atividade de p53, reduzindo os níveis de acetilação desse gene e, conseqüentemente, permitindo a aquisição temporária de características mesenquimais. A indução de EMT é importante em situações de cicatrização, mas sua manutenção pode ser crítica para invasão de tecidos vizinhos no início do processo metastático.

A associação de SPR-2A com EMT já havia sido referida por Demetris et al. (2008) em células epiteliais sob estresse. Esses autores também detectaram sua atuação como um ligante para proteínas contendo domínios SH3.

No presente trabalho, foi observada a mudança de fenótipo epitelial para fibroblastóide em células Hep-2 após indução da expressão de *SPRR2*, bem como um pequeno efeito na proliferação e na migração. Ao contrário do esperado, níveis elevados de transcritos levaram a uma significativa redução da invasão celular.

Recentemente, os estudos de Vermeij et al (2012) revelaram a capacidade das SPRs de se ligarem ao DNA dependendo dos níveis de ROS. Em condições de níveis baixos de ROS, as SPRs se ligam ao DNA e impedem que ocorram danos na molécula. Em altos níveis de ROS, as SPRs multimerizam para formar uma barreira antioxidante protetora na periferia da célula. Nessas condições, que ocorrem por exemplo durante injúria e cicatrização, os níveis de SPRs aumentam muito e promovem migração celular (Vermeij et al., 2010).

Levando em conta as considerações acima, não é difícil associar as propriedades das SPRs com o processo neoplásico e com os dados observados no presente trabalho. Espécies reativas de oxigênio são moléculas formadas durante o metabolismo do oxigênio. Baixos níveis de ROS são essenciais para uma sinalização celular eficiente. Entretanto, condições de estresse, como inflamação, radiação UV e presença de xenobióticos, podem aumentar os níveis intra- e extra-celular dessas moléculas, gerando danos no material genético, em proteínas e lipídios. Em consequência, pode ocorrer apoptose e envelhecimento celular, doenças neurodegenerativas e câncer, entre outras (Schafer & Werner, 2011).

O entendimento das funções das SPRs está no seu início. Muitos dados ainda são necessários para reconhecer suas ligações não apenas com o DNA, mas com proteínas celulares e vias de sinalização. Para isso, é de fundamental importância a clonagem dessas proteínas, sua expressão heteróloga e purificação para posteriores ensaios funcionais.

VI - CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho estão descritas abaixo:

- 1- Por análise de agrupamento, a família de genes *SPRRs* mostra dois clados principais: o primeiro com um grupo bastante similar (*SPRR2A*, *B*, *D*, *E*, *F* e pseudogene *SPRR2C*) e provavelmente dois membros ancestrais (*SPRR2G* e *SPRR4*), e o segundo clado mais heterogêneo, com os genes *SPRR1* e *SPRR3*.
- 2- Os genes *SPRRs* apresentam ausência ou baixa expressão em linhagens de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço em relação a queratinócitos bucais normais, com exceção do gene *SPRR4*.
- 3- Em amostras de CECP, os genes *SPRRs* exibem heterogeneidade de expressão entre os diferentes sítios, embora o padrão observado em laringe e soalho de boca seja bastante similar e com elevação de níveis de transcritos. Nos carcinomas de língua os genes *SPRRs* apresentam redução de expressão. Apenas o gene *SPRR3* mostra redução significativa de expressão em carcinomas orais e de laringe.
- 4- A expressão dos genes *SPRRs* não está associada à presença de metástase linfonodal.
- 5- A proteína anti-inflamatória anexina A1 inibe a expressão da maioria dos genes *SPRRs*, exceto de *SPRR2B*, *SPRR2C*, *SPRR3* e *SPRR4*.
- 6- A indução duradoura da expressão do gene *SPRR2E* resulta na mudança de fenótipo epitelial para fibroblastóide e uma significativa redução da invasão celular.
- 7- A inserção dos genes *SPRR4* e *SPRR2E* em vetor de clonagem mostra-se técnica apropriada para experimentos futuros de expressão heteróloga, produção e purificação das proteínas.

RESUMO

As proteínas pequenas ricas em prolina (*small proline-rich protein*/SPRRs) compreendem uma sub-classe específica de precursores da camada córnea, codificadas por uma família multi-gênica do complexo de diferenciação epidérmica mapeado no cromossomo 1q21. Vários estudos têm sugerido que as SPRs estão relacionadas com proliferação epitelial elevada e processos malignos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a participação das SPRs no desenvolvimento de carcinomas epidermóides de cabeça e do pescoço e no fenótipo da célula neoplásica. O perfil de expressão de onze genes *SPRRs* foi avaliado em cinco linhagens celulares (FADU, HEP-2, UM-SCC-38, SCC-9) e em carcinomas primários da cabeça e pescoço, utilizando PCR em tempo real. Os tumores foram classificados em agressivos (A) e menos agressivos (LA) dependendo da presença ou da ausência de células neoplásicas nos nódulos linfáticos regionais. Os resultados revelaram baixa expressão de genes *SPRRs* em todas as linhagens celulares, exceto o *SPRR4*. Por outro lado, foram observados níveis elevados de transcritos de *SPRR2G*, *SPRR4* e *SPRR2E* e níveis reduzidos de transcritos de *SPRR3* tanto nos grupos A e LA de carcinomas. A expressão ectópica de *SPRR2E* resultou em menor capacidade de invasão celular em ensaio de câmara de *Boyden*, bem como em mudança do fenótipo epitelial para fibroblastóide, mas não afetou a proliferação celular ou a migração. Após o tratamento das células HEP-2 com a proteína anti-inflamatória anexina A1 (peptídeo AC2-26), ocorreu um aumento substancial de expressão da maioria dos *SPRRs*, sugerindo uma associação entre SPRs e inflamação.

Os genes *SPRRs* possuem sequências altamente conservadas e, após uma análise filogenética utilizando o método de *neighbor-joining*, os resultados indicaram um grupo homogêneo, que incluiu *SPRR2* e *SPRR4*, e um grupo mais heterogêneo com *SPRR1* e *SPRR3*. Aparentemente, a diversidade de sequência destes genes é baixa. Isto sugere que o controle da dosagem da proteína pode ser mais importante para o desempenho de sua função que a complexidade estrutural.

A compreensão da função das SPRs avançou bastante nos últimos anos, mas muitas questões sobre o seu papel no processo neoplásico ainda permanecem sem resposta. Muitos dados são ainda necessários para identificar sua associação com outras proteínas e com vias de sinalização. Portanto, é importante melhorar nosso conhecimento sobre a regulação e a função de cada RPN, para que as descobertas obtidas na pesquisa básica sejam traduzidas em aplicações clínicas.

ABSTRACT

The small proline rich proteins (SPRs) constitute a specific sub-class of cornified cell envelope precursors, encoded by a multi-gene family which are part of the epidermal differentiation complex on chromosome 1q21. Several studies have suggested that the SPRs are related to increased epithelial proliferation and to malignant processes. The present work aimed to investigate the participation of SPRs in the development of head and neck squamous cell carcinomas and in the phenotype of the neoplastic cell. The expression profile of eleven *SPRR*s genes was evaluated in five cell lines (FaDu, HEP-2, UM-SCC-38, SCC-9) and in primary carcinomas from head and neck, using real time PCR. The tumors were classified as aggressive (A) and less aggressive (LA) depending on the presence or absence of neoplastic cells in the regional lymph nodes. The results revealed low expression of *SPRR*s genes in all cell lines, except *SPRR4*. Otherwise, high levels of *SPRR2G*, *SPRR4* and *SPRR2E* and low levels of *SPRR3* transcripts were observed in both A and LA carcinomas. Ectopic *SPRR2E* expression resulted in reduced cell invasion evaluated by a Boyden chamber assay together with morphologic changes from epithelial to *fibroblast*-like phenotype, but did not affected cell proliferation or migration. After treatment of HEP-2 cell line with the anti-inflammatory protein annexin A1 (peptide Ac2-26), there was a substantial increase of expression of most *SPRR*s, suggesting an association between SPRs and inflammation.

The *SPRR*s genes have highly conserved sequences and, after a phylogenetic analysis using the neighbor-joining method, the results indicated a homogeneous group including *SPRR2* and *SPRR4*, and a more heterogeneous group with *SPRR1* and *SPRR3*. Apparently, the sequence diversity of these genes is low. This suggests that the control of protein dosage may be more important to the performance of their function than the structural complexity.

The understanding of the function of SPRs has advanced in the past years but many questions on their role in the tumorigenic process still remain unanswered. Much more data are required to recognize their association to other proteins and signaling pathways. Therefore, it is important to improve our knowledge on the regulation and function of each SPRs in order to translate findings from basic research into clinical applications.

- Abraham, J.M.; Wang, S.; Suzuki, H. *et al.* Esophagin cDNA cloning and characterization: a tissue-specific member of the small proline-rich protein family that is not expressed in esophageal tumors. Cell Growth Differ. v.7, n.7. p. 855-60. Jul. 1996.
- Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York and London: Garland Science; 2002.
- Backendorf, C.; Hohl, D. A common origin for cornified envelope proteins? Nat Genet v.2, p.91. 1992.
- Becker, M.T.; Shores, C.G.; Yu, K.K.; Yarbrough, W.G. Molecular assay to detect metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. v.130, n.1, p. 21-7. Jan. 2004.
- Bragulla, H.H.; Homberger, D.G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. J Anat. v.214, n. 4, p. 516-59. Apr. 2009.
- Burton, M.J.; Rajak, S.N.; Bauer, J. *et al.* Conjunctival transcriptome in scarring trachoma. Infect Immun. v.79, n.1, p.499-511. Jan. 2011.
- Cabral, A.; Voskamp, P.; Cleton-Jansen, A.M. *et al.* Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. J Biol Chem. V.276, n.22, p. 19231-7. Jun. 2001.
- Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol. V.6, n.4, p.328-40. Apr. 2005.
- Cho, D.H.; Jo, Y.K.; Roh, S.A. *et al.* Upregulation of SPRR3 promotes colorectal tumorigenesis. Mol Med. V.16, n.7-8, p. 271-7. Jul-Aug. 2010.
- Chung, C.H.; Parker, J.S.; Ely, K. *et al.* Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. v.66, n.16, p. 8210-8. Aug. 2006.
- de A Simão, T.; Souza-Santos, P.T.; de Oliveira, D.S.; *et al.* Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR and its potential use as a biomarker. Exp Mol Pathol. V.91, n.2, p. 584-9. Oct. 2011.
- De Heller-Milev, M.; Huber, M.; Panizzon, R. *et al.* Expression of small proline rich proteins in neoplastic and inflammatory skin diseases. Br J Dermatol. V.143, n.4, p. 733-40. Oct. 2000.
- De Paiva, C.S.; Villarreal, A.L.; Corrales, R.M. *et al.* Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon-gamma. Invest Ophthalmol Vis Sci. v.48, n.6, p. 2553-60. Jun. 2007.
- De Wever, O.; Mareel, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol. v.200, n.4, p. 429-47. Jul. 2003.
- Demetris, A.J.; Specht, S.; Nozaki, I. *et al.* Small proline-rich proteins (SPRR) function as SH3 domain ligands, increase resistance to injury and are associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cholangiocytes. J Hepatol. V.48, n.2, p.276-88. Feb. 2008.

- DeMuth, J.P.; Weaver, D.A.; Crawford, E.L. *et al.* Loss of spr1 expression measurable by quantitative RT-PCR in human bronchogenic carcinoma cell lines. Am J Respir Cell Mol Biol. v.19, n.1, p.25-9. Jul. 1998.
- Ferlay, J.; Parkin, D.M.; Steliarova-Foucher, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer. v.46, n.4, p. 765-81. Mar. 2010.
- Finkelman, F.D.; Yang, M.; Perkins, C. *et al.* Suppressive effect of IL-4 on IL-13-induced genes in mouse lung. J Immunol. V.174, n. 8, p. 4630-8. Apr. 2005.
- Fischer, D.F.; Backendorf, C. Identification of regulatory elements by gene family footprinting and in vivo analysis. Adv Biochem Eng Biotechnol. V.104, p. 37-64. 2007.
- Fischer, D.F.; Gibbs, S.; van De Putte, P., Backendorf, C. Interdependent transcription control elements regulate the expression of the SPRR2A gene during keratinocyte terminal differentiation. Mol Cell Biol. V.16, n.10, p. 5365-74. Oct. 1996.
- Fischer, D.F.; Sark, M.W.; Lehtola, M.M. *et al.* Structure and evolution of the human SPRR3 gene: implications for function and regulation. Genomics. V. 55, n.1, p.88-99. Jan. 1999.
- Flower, R.J.; Rothwell, N.J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. Trends Pharmacol Sci. v.15, n.3, p. 71-6. Mar. 1994.
- Fujimoto, W.; Nakanishi, G.; Arata, J.; Jetten, A.M. Differential expression of human cornifin alpha and beta in squamous differentiating epithelial tissues and several skin lesions. J Invest Dermatol. V.108, n.2, p.200-4. Feb. 1997.
- Gibbs, S.; Fijneman, R.; Wiegant, J. *et al.* Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. Genomics. V.16, n.3, p. 630-7. Jun. 1993.
- Grando, S.A.; Horton, R.M.; Mauro, T.M. *et al.* Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. J Invest Dermatol. v.107, n.3, p. 412-8, Sep. 1996.
- Greenman, J.; Homer, J.J.; Stafford, N.D. Markers in cancer of the larynx and pharynx. Clin Otolaryngol Allied Sci. v.25, n.1, p. 9-18. Feb. 2000.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. v.144, n.5, p. 646-74. Mar. 2011.
- Hanakawa, Y.; Amagai, M. Shirakata, Y. *et al.* Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. J Invest Dermatol. v.119, n.6, p. 1231-6. Dec. 2002.
- Hashibe, M.; Brennan, P.; Chuang, S-C. *et al.* Interaction Between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers v.18, n.2, p. 541-50. Jan. 2009.
- He, Y.; Rajantie, I.; Pajusola, K. *et al.* Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. Cancer Res. v.65, n.11, p.4739-46. Jun. 2005.

- Hecht, S.S. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. Chem Res Toxicol. V.21, n.1, p.160-71. Jan. 2008.
- Herrero, R.; Castellsagué, X.; Pawlita, M. *et al.* IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. 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. 2003.
- Hohl, D.; de Viragh, P.; Amiguet-Barras, F. *et al.* The small prolinerich proteins constitute a multigene family of differentially regulated cornified cell envelope precursor proteins. J Invest Dermatol v.104, p.902±9. 1995.
- Hoffjan, S.; Stemmler, S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. Br J Dermatol. v. 157, n.3, p. 441-9. Jun. 2007
- Homann, N.; Kärkkäinen, P.; Koivisto, T.. *et al.* Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. J. Natl. Cancer Inst., v.89, n.22p. 1692–1697. 1997
- Hombach-Klonisch, S.; Paranjothy, T.; Wiechec, E. *et al.* Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). V.56, n.3, p.165-80. May-Jun. 2008.
- Hu, R.; Wu, R.; Deng, J.; Lau, D. A small proline-rich protein, spr1: specific marker for squamous lung carcinoma. Lung Cancer. v.20, n.1, p. 25-30. Apr. 1998.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**. v. 90. p. 1-636. 2007.
- Jarzab, J.; Filipowska, B.; Zebracka, J. *et al.* Locus 1q21 Gene expression changes in atopic dermatitis skin lesions: deregulation of small proline-rich region 1A. Int Arch Allergy Immunol. V.151, n.1, p. 28-37. 2010.
- Jetten, A.M.; De Luca, L.M.; Nelson, K. *et al.* Regulation of cornifin alpha expression in the vaginal and uterine epithelium by estrogen and retinoic acid. Mol Cell Endocrinol. v.123, n. 1, p. 7-15. Oct. 1996.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
- Kainu, K.; Kivinen, K.; Zucchelli, M. *et al.* Association of psoriasis to PGLYRP and SPRR genes at PSORS4 locus on 1q shows heterogeneity between Finnish, Swedish and Irish families. Exp Dermatol. v.18, n.2, p. 109-15. Feb. 2009.
- Kalinin, A.; Marekov, L.N.; Steinert, P.M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. J Cell Sci v.114, p. 3069-70. 2001.
- Kartasova, T.; Darwiche, N.; Kohno, Y. *et al.* Sequence and expression patterns of mouse SPR1: Correlation of expression with epithelial function. J Invest Dermatol. v.106, n.2, p. 294-304. Feb. 1996.

- Katou, F.; Shirai, N.; Kamakura, S. Differential expression of cornified cell envelope precursors in normal skin, intraorally transplanted skin and normal oral mucosa. Br J Dermatol. V.148, n.5, p. 898-905. May. 2003.
- Kim, J.C.; Yu, J.H.; Cho, Y.K. *et al*. Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation in less advanced stages of breast cancer. Breast Cancer Res Treat. v.133, n.3, p. 909-16. Jun. 2012.
- Kimchi, E.T.; Posner, M.C.; Park, J.O. *et al*. Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. Cancer Res. v.65, n.8, p. 3146-54. Apr. 2005.
- Kowalski, L.P.; Sanabria, A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. Acta Otorhinolaryngol v.27, n. 3, p. 113-7. Jun. 2007.
- Lau, D.; Xue, L.; Hu, R. *et al*. Expression and regulation of a molecular marker, SPR1, in multistep bronchial carcinogenesis. Am J Respir Cell Mol Biol. v.22, n.1, p. 92-6. Jan. 2000.
- Lea, I.A.; Jackson, M.A.; Li, X. *et al*. Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. Carcinogenesis. V. 28, n.9, p. 1851-8. Sep. 2007.
- Lee, C.H.; Marekov, L.N.; Kim, S. *et al*. Small proline-rich protein 1 is the major component of the cell envelope of normal human oral keratinocytes. FEBS Lett. v.477, n.3, p. 268-72. Jul. 2000.
- Lee, J.; Taneja, V.; Vassallo, R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. J Dent Res. v.91, n.2, p.142-9. Feb. 2012.
- 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.
- Leemans, C.R.; Braakhuis, B.J.M; Brakenhoff, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. Nature Reviews Cancer. v.11, n.1, p.9-22. Dez. 2010.
- Li, S.; Nikulina, K.; DeVoss, J. *et al*. Small proline-rich protein 1B (SPRR1B) is a biomarker for squamous metaplasia in dry eye disease. Invest Ophthalmol Vis Sci. v.49, n.1, p.34-41. Jan. 2008.
- Lohman, F.P.; Gibbs, S.; Fischer, D.F. *et al*. Involvement of c-JUN in the regulation of terminal differentiation genes in normal and malignant keratinocytes. Oncogene. v.14, n.13, p. 1623-7. Apr. 1997a.
- Lohman, F.P.; Medema, J.K.; Gibbs, S. *et al*. Expression of the SPRR cornification genes is differentially affected by carcinogenic transformation. Exp Cell Res. v.231, n.1, p.141-8. Feb. 1997b.
- Luo, A.; Kong J.; Hu, G. *et al*. Discovery of Ca²⁺-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. Oncogene. V.23, n.6, p. 1291-9. Feb. 2004.
- Marshall, D.; Hardman, M.J.; Nield, K.M.; Byrne, C. Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope. Proc Natl Acad Sci USA v.98, p.13031-6. 2001.

- Martin, N.; Patel, S.; Segre, J.A. Long-range comparison of human and mouse Sprr loci to identify conserved noncoding sequences involved in coordinate regulation. Genome Res. v.14, n.12, p. 2430-8. Dec. 2004.
- Maru, D.M.; Singh, R.R.; Hannah, C. *et al.* MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. Am J Pathol. V.174, n.5, p. 1940-8. May. 2009.
- Marur, S.; D'Souza, G.; Westra, W.H. *et al.* HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol. v.11, n.8, p. 781-9. Aug. 2010.
- Martinet, N.; Beninati, S.; Nigra, T. P. *et al.* N1N8-Bis(y-glutamyl)spermidine cross-linking in epidermal-cell envelopes Biochem. J. v.271, p. 305–308. 1990.
- McLean, W.H.; Irvine, A.D. Disorders of keratinisation: from rare to common genetic diseases of skin and other epithelial tissues. Ulster Med J. v.76, n.2, p.72-82. May. 2007.
- Mehrotra, R.; Ibrahim, R.; Eckardt, A.; *et al.* Novel strategies in therapy of head and neck cancer. Curr Cancer Drug Targets. v.11, n.4, p. 465-78. May. 2011.
- Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. 2011.
- Mischke, D.; Korge, B.P.; Marenholz, I. *et al.* Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. J Invest Dermatol v.106, p.989-92. 1996.
- Mizuguchi, Y.; Specht, S.; Lunz, J.G. *et al.* SPRR2a enhances p53 deacetylation through HDAC1 and down regulates p21 promoter activity. BMC Mol Biol. v.13, n.1, p.20. Jun. 2012.
- Molinolo, A.A.; Amornphimoltham, P.; Squarize, C.H. *et al.* Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. Oral Oncol. v.45, n.4-5, p. 324-34. Apr-May 2009.
- Nishitani, J.; Chen, Z.; Qin, M.; *et al.* Identification of genes required for immortalization in human papillomavirus-infected human oral keratinocytes. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). v. 48. 2002
- Okuyama, R.; Tagami, H.; Aiba, S. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. J Dermatol Sci. v.49, n.3, p.187-94. Mar. 2008.
- Pantel, K., Brakenhoff, R.H. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer. v.4, n.6, p. 448-56. Review. Jun. 2004
- Pasini, F.S.; Maistro, S.; Snitcovsky, I. *et al.* Four-gene expression model predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. Acta Oncol. v. 51, n.1, p. 77-85. Jan. 2012.
- Patterson, T.; Vuong, H.; Liaw, Y.S.; *et al.* Mechanism of repression of squamous differentiation marker, SPRR1B, in malignant bronchial epithelial cells: role of critical TRE-sites and its transacting factors. Oncogene. V.20, n.5, p.634-44. Feb. 2001.

- Peterson, P.E. Oral cancer prevention and control-the approach of the World Health Organization. Oral Oncol. v.45, p. 454-60. 2009.
- Presland, R.B.; Dale, B.A. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. Crit Rev Oral Biol Med v.11, p. 383-408. 2000.
- Presland, R.B.; Jurevic, R.J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. J Dent Educ. V.66, n.4, p.564-74. Apr. 2002.
- Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.M. The skin: an indispensable barrier. Exp Dermatol. V.17, n.12, p. 1063-72. Dec. 2008.
- Reddy, S.P.; Vuong, H.; Adiseshaiah, P. Interplay between proximal and distal promoter elements is required for squamous differentiation marker induction in the bronchial epithelium: role for ESE-1, Sp1, and AP-1 proteins. J Biol Chem. v.278, n. 24, p. 21378-87. Jun. 2003.
- Reidy, J; McHugh, E.; Stassen, L.F. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. Surgeon. V. 9, n.5, p. 278-83. Oct. 2011.
- Rheinwald, J.G.; Beckett, M.A. Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. Cell. v.22, p. 629-32. Nov. 1980.
- Robinson, P.A.; Marley, J.J.; High, A.S.; Hume, W.J.. Differential expression of protease inhibitor and small proline-rich protein genes between normal human oral tissue and odontogenic keratocysts. Arch Oral Biol. v.39, n.3, p. 251-9. Mar. 1994.
- Rodrigues-Lisoni, F.C.; Mehet, D.K.; Peitl, P. *et al.* In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. FEBS Lett. v.580, n.5, p. 1431-8. Feb. 2006.
- Rodriguez, T.; Altieri, A.; Chatenoud, L. *et al.* Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. Oral Oncol. v.40, n.2, p. 207-13. Feb. 2004.
- Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. Molecular biology and evolution, 4, 406–425. 1987.
- Saman, D.M. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. Head Neck Oncol. v.13, n.4, p. 1, Review. Jan. 2012.
- Sawicki, M.; Szudy, A.; Szczyrek, M. *et al.* Molecularly targeted therapies in Head and Neck Cancers, Otolaryngologia Polska (2010), doi:10.1016/j.otpol.2012.06.021
- Schäfer, M.; Werner, S. The cornified envelope: a first line of defense against reactive oxygen species. J Invest Dermatol. V.131, n.7, p. 1409-11. Jul. 2011.
- Sedivy, R.; Beck-Mannagetta, J.; Haverkamp, C. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. J Oral Pathol Med. v.32, n.8, p. 455-60. Sep. 2003.
- Silveira, N.J.; Varuzza, L.; Machado-Lima, A. *et al.* Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. BMC Med Genomics. V.11, n.1, p. 56. Nov. 2008.

- Simanowski, U.A.; Seitz, H.K.; Baier, B. *et al.* Chronic ethanol consumption selectively stimulates rectal cell proliferation in the rat. Gut. V.27, n.3, p.278-82. Mar. 1986.
- Simanowski, U.A.; Suter, P.; Stickel, F. *et al.* Esophageal epithelial hyperproliferation following long-term alcohol consumption in rats: effects of age and salivary gland function. J Natl Cancer Inst. V.85, n.24, p.2030-3. Dec. 1993.
- Simanowski, U.A.; Stickel, F.; Maier, H.; *et al.* Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. Alcohol. V.12, n.2, p. 111-5. Mar. 1995.
- Slaughter, D.P.; Southwick, H.W.; Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer. v.6, n.5, p. 963-8. Set. 1953.
- Smith, E.M.; Ritchie, J.M.; Pawlita, M. *et al.* Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. Int J Cancer. v.120, n.4, p.825-32. Feb. 2007.
- Song, H.J.; Poy, G.; Darwiche, N. *et al.* Mouse Sprr2 genes: a clustered family of genes showing differential expression in epithelial tissues. Genomics. V.55, n.1, p. 28-42, Jan. 1999.
- Steinert, P.M. Keratins: dynamic, flexible structural proteins of epithelial cells. Curr Probl Dermatol. v.54, p.193–198. 2001.
- Steinert, P.M.; Kartasova, T.; Marekov, L.N. Biochemical evidence that small proline-rich proteins and trichohyalin function in epithelia by modulation of the biomechanical properties of their cornified cell envelopes. J Biol Chem. v.273, n.19, p. 11758-69. May. 1998.
- Steinert, P.M.; Marekov, L.N. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. J Biol Chem. V.270, n.30, p. 17702-11. Jul. 1995.
- Steinert, P.M.; Steven, A.C.; Roop, D.R. The molecular biology of intermediate filaments. Cell. v.42, n.2, p. 411-20. Sep. 1985.
- Steinert, P.M.; Wantz, M.L.; Idler, W.W. O-phosphoserine content of intermediate filament subunits. Biochemistry. V.21, n.1, p. 177-83. Jan. 1982.
- Syrjänen, S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. Ann Oncol. Suppl 7, p. 243-5. Oct. 2010
- Takes, R.P.; Baatenburg de Jong, R.J.; Schuurin, E. *et al.* Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. Anticancer Res. v.18, n. 6B, p.4793-800. Dez. 1998.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. V.24, n.8, p.1596-9. Aug. 2007.
- Tesfaigzi ,J.; Th'ng , J.; Hotchkiss , J.A. *et al.* A small proline-rich protein, SPRR1, is upregulated early during tobacco smoke-induced squamous metaplasia in rat nasal epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol. v.14, n.5, p.478-86. May. 1996a.

- Tesfaigzi, J.; Carlson, D.M. Cell cycle-specific expression of G(0)SPR1 in Chinese hamster ovary cells. Exp Cell Res. v.228, n.2, p. 277-82. Nov. 1996b.
- Tesfaigzi, Y.; Wright, P.S.; Belinsky, S.A. SPRR1B overexpression enhances entry of cells into the G0 phase of the cell cycle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. V.285, n.4, p.L889-98. Oct. 2003.
- Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Ver Cancer. v.2, n.6, p. 442-54. Jun. 2002.
- Tong, L.; Corrales, R.M.; Chen, Z. *et al.* Expression and regulation of cornified envelope proteins in human corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. v.47, n.5, p. 1938-46. May. 2006.7
- Vermeij, W.P.; Backendorf, C. Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing. PLoS One. V.5,n.8, p.e11957. Aug. 2010.
- Vermeij, W.P.; Florea, B.I.; Isenia, S. *et al.* Proteomic Identification of in Vivo Interactors Reveals Novel Function of Skin Cornification Proteins. J Proteome Res. v.11, p.3068–3076. 2012.
- Vineis, P.; Alavanja, M.; Buffler, P. *et al.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. J Natl Cancer Inst. v.96, n.2, p. 99-0106. Jan. 2004.
- Wreesmann, V.B.; Wang, D.; Goberdhan, A. *et al.* Genetic abnormalities associated with nodal metastasis in head and neck cancer. Head Neck. v.26, n. 1, p.10-5. Jan. 2004.
- Yaar, M.; Eller, M.S.; Bhawan, J. *et al.* In vivo and in vitro SPRR1 gene expression in normal and malignant keratinocytes. Exp Cell Res. v.217, n.2, p.217-26. Apr. 1995.
- Yan, M.; Xu, Q.; Zhang, P. *et al.* Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. BMC Cancer. v.10, p. 437. Aug. 2010.
- Zhang, Y.; Feng, Y.B.; Shen, X.M. *et al.* Exogenous expression of Esophagin/SPRR3 attenuates the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma cells via promoting apoptosis. Int J Cancer. v.122, n.2, p. 260-6. Jan. 2008.
- Zhang, Z.; Filho, M.S.; Nör, J.E. The biology of head and neck cancer stem cells. Oral Oncol. v.48, n.1, p. 1-9. Jan. 2012.
- Zinovyeva, M.V. Identification of some human genes oppositely regulated during esophageal squamous cell carcinoma formation and human embryonic esophagus development Diseases of the Esophagus. v.23, p. 260-270. 2010.
- Zimmermann, N.; Doecker, M.P.; Witte, D.P. *et al.* Expression and regulation of small proline-rich protein 2 in allergic inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. v.32, n.5, p. 428-35. May. 2005.

Tabela: Valores estatísticos referentes à análise por PCR em tempo real da expressão dos genes *SPRRs*, na comparação dos sítios anatômicos (língua, laringe e soalho de boca) e entre os grupos N0 e N+, independentemente do sítio. Os dados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0.05$ (*).

GENES	N0 X N+	LÍNGUA X LARINGE	LÍNGUA X SOALHO DE BOCA	LARINGE X SOALHO DE BOCA
<i>SPRR1A</i>	P= 0.6649	P= 0.0012	P= 0.0138	P= 0.3658
<i>SPRR1B</i>	P= 0.8425	P= 0.0037	P= 0.0221	P=0.1483
<i>SPRR2A</i>	P=0.6880	P=0.0052	P=0.0054	P=0.3546
<i>SPRR2B</i>	P=0.2620	P=0.0101	P=0.0287	P=0.3369
<i>SPRR2C</i>	P=0.2994	P=0.0020	P=0.0024	P=0.8249
<i>SPRR2D</i>	P=0.5483	P=0.0058	P=0.0155	P=0.3856
<i>SPRR2E</i>	P=0.2407	P< 0.0001	P< 0.0001	P=0.6132
<i>SPRR2F</i>	P=0.2751	P=0.0317	P=0.0441	P=0.8449
<i>SPRR2G</i>	P=0.7721	P=0.0461	P=0.0245	P=0.6630
<i>SPRR3</i>	P=0.4456	P=0.0338	P=0.0064	P=0.4744
<i>SPRR4</i>	P=0.1538	P=0.2998	P=0.4605	P=0.5264