Flavia Regina Rotea Mangone

Determinação do perfil de expressão dos RNAs mensageiros da família das Smads e dos componentes do complexo AP-1 em carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço.

Tese apresentada ao Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra Miriam Hatsue Honda Federico

**São Paulo
2005**

DEDICATÓRIA

A minha família:

*Ao meu marido, meu amor, pelo carinho,
paciência e incentivo.*

*Aos meus pais e irmãos pelo apoio, e
confiança.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Miriam Hatsue Honda Federico pelos ensinamentos, pela orientação e confiança. Agradeço pelo seu apoio profissional e pessoal que a fez ser mais do que minha orientadora.

À Profª Drª Mitzi Brentani pelo estímulo e incentivo a pesquisa como um todo, bem como a especial colaboração dada na parte relativa aos fatores transcricionais AP1.

Às colegas do grupo Fátima Pasini, Simone Maistro, Cristina Campofiorito e Karen Brunialti, pelo apoio e companheirismo dedicados em todos esses anos.

Ao Dr Fernando Walder e Dr Carlos Lehn pela dedicação e pelo empenho com que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Prof Dr Fernando A Soares e à sua equipe no Departamento de Patologia do Hospital do Câncer AC Camargo, Dr. Hugo Campos, Dra Maria Dirlei Begnani, Sra Suely Nonogaki, Sr Carlos Nascimento, Sr Severino Ferreira e Sr. André Abreu, pela valiosa colaboração na parte relativa ao estudo de Fra-1 por tissue array.

Ao Dr Humberto Torlone pelo valioso apoio dado na fase de ensaios de imunohistoquímica de Fra-1.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Oncologia pelo carinho, atenção e amizade dedicados todos os dias e que tornou muito prazerosa a nossa convivência durante a realização deste trabalho. A todos vocês, muito obrigada!!

À Capes e à Fapesp (Processo nº 02/01389) pelo apoio financeiro.

LISTA DE UNIDADES
ABREVIATURAS

LISTA DE UNIDADES

- **μg** micrograma
- **μL** microlitro
- **μM** micromolar
- **bp** pares de bases
- **cm** centímetro
- **cpm** contagens por minuto
- **g** grama
- **h** hora
- **kb** kilobase
- **L** litro
- **M** molar
- **min** minuto
- **mL** mililitro
- **mm** milímetro
- **mM** milimolar
- **ng** nanograma
- **nm** nanômetro
- **nM** nanomolar
- **rpm** rotações por minuto
- **V** volts

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AMPc** adenosina monofosfato cíclico
- **AP-1** proteína ativadora-1
- **ATF** Fator ativador de transcrição
- **cdk** quinase dependente de ciclina
- **cDNA** ácido desoxiribonucléico complementar
- **co-Smad** Smad comum ou co-mediadora
- **CRE** elemento de resposta ao AMP cíclico
- **DEPC** dietilpirocarbonato
- **DNA** ácido desoxiribonucléico
- **DTT** dietiltreitól
- **EGF** fator de crescimento epidermal
- **EGF-R** receptor do fator de crescimento epidermal
- **fase:**
 - G1** *Gap1* fase de pré-síntese de DNA
 - G2** *Gap2* fase de pós-síntese de DNA
 - S** fase de síntese de DNA

- **HNSCC** carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço
(*head neck squamous cell carcinoma*)
- **INCA** Instituto Nacional do Câncer
- **INK** inibidor de ciclina quinase
- **I-Smad** Smad inibitória
- **KIP** proteína inibidora de quinase
- **M** mitose
- **MAPK** proteína quinase ativada por mitógeno
- **N** mucosa normal adjacente
- **neg** negativo
- **PCR** reação da polimerase em cadeia
- **pN+** pacientes com metástase em linfonodos
- **pN0** pacientes sem metástase em linfonodos
- **pos** positivo
- **pRb** proteína retinoblastoma
- **RNA_m** ácido ribonucléico mensageiro
- **RNA_r** ácido ribonucléico ribossômico
- **RNAse** Ribonuclease
- **RNA_t** ácido ribonucléico transportador
- **RPA** Ensaio de Proteção à Ribonuclease
- **R-Smad** Smad ativada pelo receptor
- **RT** Transcrição Reversa
- **SBE** Elemento de ligação a Smad
- **Sig** significância estatística
- **T** tecido tumoral
- **TβR I** receptor de TGFβ tipo I
- **TβR II** receptor de TGFβ tipo II
- **TGFβ** fator transformante do crescimento β
- **TRE** elemento de resposta ao éster-forbol
- **UV** ultravioleta
- **vs** *versus*

LISTA DE FIGURAS

Figura A		pág 04
Esquema da ativação dos receptores de TGF β .		
Figura B		pág 06
Esquema da transdução de sinal de TGF β .		
Figura C		pág 08
Esquema representando AP-1 como alvo de TGF β .		
Figura D		pág 63
Esquema representando as duas hipóteses para o aumento de Smad 6 observado nos tumores de HNSCC.		
Figura 1		pág 38
Expressão de Smads 1-8 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço através do ensaio de RPA.		
Figura 2		pág 39
Análise de Boxplot representando a expressão dos mRNA das Smads 1-8 em HNSCC.		
Figura 3		pág 40
Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC e mucosa adjacente.		
Figura 4		pág 41
Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC e mucosa adjacente nos subgrupos pT e pN.		
Figura 5		pág 42
Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC da cavidade oral e mucosa adjacente.		

Figura 6	pág 43
Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC da cavidade oral e mucosa adjacente nos subgrupos pT e pN.	
Figura 7	pág 45
Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC da laringe e mucosa adjacente.	
Figura 8	pág 46
Curvas de sobrevida global de pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral.	
Figura 9	pág 47
Curvas de sobrevivência global de pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral.	
Figura 10	pág 51
A. Foto representativa de hibridização de Northern Blot com sondas para a família AP-1.	
B. Ensaio representativo de RT-PCR semi-quantitativa de junB.	
Figura 11	pág 52
Análise de Boxplot representando a expressão dos mRNAs de junD, c-fos, fosB, fra-1 e fra-2 em HNSCC e mucosa normal adjacente.	
Figura 12	pág 53
Distribuição dos pacientes de acordo com a expressão do mRNA de Fra-1 e o estatus nodal.	
Figura 13	pág 55
Fotos representativas do ensaio de <i>tissue array</i> com anticorpo anti-Fra-1.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1		pág 15
Características clínico-patológicas dos pacientes portadores de HNSCC, submetidos à cirurgia terapêutica no Hospital Heliópolis, utilizados na determinação da expressão dos mRNAs da família das Smads por RPA.		
Tabela 2		pág 16
Características clínico-patológicas dos pacientes portadores de HNSCC, submetidos à cirurgia terapêutica no Hospital Heliópolis, estudados para a determinação da expressão dos mRNAs de AP-1 por Northern Blot.		
Tabela 3		pág 16
Características clínico-patológicas dos pacientes portadores de HNSCC, submetidos à cirurgia terapêutica no Hospital AC Camargo, estudados para a determinação da expressão da proteína de Fra-1 por <i>tissue array</i> .		
Tabela 4		pág 29
Seqüência dos <i>primers</i> sense e anti-sense utilizados nas reações de PCR.		
Tabela 5		pág 44
Média e desvio padrão relativo a expressão de cada Smad nos tumores de laringe e na mucosa adjacente.		
Tabela 6		pág 49
Análise de sobrevida dos pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral, estratificados em Smad positivos e negativos no grupo como um todo e nos subgrupos prognósticos pN0 e pN+.		
Tabela 7		pág 54
Resumos dos resultados imunohistoquímicos com anticorpo anti- Fra-1, no ensaio de <i>tissue array</i> em HNSCC e mucosa adjacente.		

RESUMO

A via fator transformante do crescimento (TGF) $\beta 1$, em células epiteliais normais, é uma importante via antiproliferativa que, parece estar alterada em carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (HNSCC). A família das Smads, os principais sinalizadores dessas via, junto com as proteínas ativadoras-1 (AP-1) parecem ser alvos da ação de TGF β . Neste trabalho, nossos objetivos foram estudar a expressão dos mRNAs das Smads e de membros da família AP1/ jun-fos, avaliando possíveis correlações entre esses marcadores e parâmetros clínico-patológicos e de prognóstico dos pacientes com HNSCC. Sucintamente, estudamos prospectivamente a expressão dos mRNAs das Smads 1-8 (n=90), por Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA), e dos membros da família AP-1 (c-jun, junB, junD, c-fos, fos-B, fra-1 e fra-2, n=45), por Northern Blot, em fragmentos de tumor e mucosa normal adjacente de pacientes com HNSCC submetidos a cirurgia curativa. Todos os pacientes foram avisados dos procedimentos e concordaram por escrito em participar da pesquisa. Nossos resultados apontaram para um aumento global da expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC quando comparado a mucosa adjacente. Em um seguimento de 43 meses (0,23 a 43,27 meses de variação), as curvas de sobrevida de Kaplan Meier para o grupo Smad 6- (com expressão de Smad 6 abaixo da mediana do tumor) mostraram sobrevida mediana de 14,6 meses enquanto que o grupo Smad 6+ não alcançou a sobrevida mediana (Log Rank = 0,005, univariada). Essa vantagem de sobrevida foi confirmada como sendo independente do status nodal pela análise multivariada de Cox (p=0,03). Com relação à família AP-1, somente Fra-1 mostrou-se aumentado nos tumores (p=0,006 testeT) e a positividade na expressão do mRNA de Fra-1 apresentou uma relação direta com a presença de linfonodos comprometidos (p= 0,006 teste de Fisher). Diante desses resultados, avaliamos o padrão de imunoreatividade de Fra-1 em 180 tumores e 29 mucosas normais adjacente de um banco de blocos em parafina, usando para isso, o *tissue array*. Uma fraca imunoreatividade, restrita à camada basal, foi detectada em 79% das mucosas em contraste à intensa reatividade observada nos tumores. No subgrupo de tumores da cavidade oral, foi detectada uma mudança no padrão de reatividade variando com o a presença ou não de comprometimento linfonodal, ou seja, a marcação passou de nuclear/citoplasmática no grupo pN0 para exclusivamente citoplasmática no grupo pN+ (p=0,0005 teste de Fisher). Conclusão, nós encontramos uma indução gênica e acúmulo de Fra-1 que pode contribuir para o fenótipo neoplásico em HNSCC. Além disso, a positividade de Smad 6 parece ser um marcador preditivo de bom prognóstico promissor em HNSCC, e que merece ser melhor estudado futuramente.

ABSTRACT

The transforming growth factor (TGF) β 1 is an important antiproliferative pathway in normal epithelial cells that seems to be disrupted in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). One candidate target of this disruption in HNSCC is the Smad family of transcriptional activators, possibly in collaboration with activatin protein-1 (AP-1). In this work, our aim was to evaluate the mRNA expression of Smads1-8 and of AP-1 members, looking for possible correlations between these markers and clinical-pathological parameters and prognosis of patients with HNSCC. Briefly, we have prospectively studied the mRNA expression of Smads 1-8 (n=90), by Ribonuclease Protection Assay (RPA) and of AP-1 family members (c-jun, junB, junD, c-fos, fos-B, fra-1 e fra-2, n=45), by Northern Blot, in fragments of tumor and adjacent normal mucosa of HNSCC patients submitted to curative surgery. All patients were advised of the procedures and agreed to participate of the research. Our results showed a global Smad mRNA overexpression in HNSCC as compared to normal mucosa. The Kaplan Meir survival curves of patients defined as Smad 6- (with Smad 6 densitometric values under the median of tumors) presented a median survival of 14.6 months while the smad 6+ did not reach the median survival (Log Rank = 0.005, univariate), after 43 month follow-up (range varying from 0.23 to 43.27 months). This overall advantage was confirmed as independent of nodal status by Cox multivariate analysis (p=0.03). In relation to AP-1, only Fra-1 was overexpressed in tumors (p=0.006 t-test) and its positivity was directly related to compromised lymph node (p=0.006 Fisher's test). Then, Fra-1 protein staining was assessed in a collection of 180 tumors and 29 histologically normal samples adjacent to tumors in a tissue array. Weak reactivity, restricted to the basal cell layer, was detected in 79% of tumor adjacent normal tissues as opposed to the intense reactivity of cancer tissues. In the subgroup of oral cancers, we have seen a shift in Fra-1 immunoreactivity, as long as the number of patients in each category, cytoplasmic or nuclear/cytoplasmic staining, was analysed (Fischer exact test, p=0.0005). In conclusion, we have found a gene induction and accumulation of Fra-1 protein which may contribute to the neoplastic phenotype in HNSCC. Importantly, Smad 6 positivity seems to be a promising predictive marker of good prognosis in HNSCC which deserves to be better studied in future studies.

SUMÁRIO

Lista de Unidades e Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃOpág 1

CAUÍSTICA E MÉTODOSpág 14

Casuísticapág 15

Extração de RNA totalpág 18

Ensaio de Proteção à Ribonucleasepág 19

Northern Blotpág 24

RT-PCR semiquantitativapág 32

***Tissue Array*pág 33**

RESULTADOSpág 36

Smadspág 37

AP-1pág 50

DISCUSSÃOpág 56

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICASpág 68

ANEXOpág 76

INTRODUÇÃO

O carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (HNSCC) está entre os tumores mais comuns em homens, constituindo cerca de 5% dos novos casos de câncer diagnosticados no norte da Europa e nos Estados Unidos (Xu e cols., 1998). Estima-se que, anualmente, mais de 500.000 novos casos de HNSCC sejam diagnosticados no mundo, e com incidência em ascensão (Johnson e cols., 1993). Além disso, estima-se que por ano, no mundo todo, os cânceres da cavidade oral e da faringe sejam responsáveis por cerca de 197.000 mortes, sendo 74% delas nos países em desenvolvimento (Pisani e cols., 1999). No Brasil, os carcinomas da cavidade oral correspondem a 5% dos casos de câncer diagnosticados, sendo que em 2003, foram estimados 10.635 novos casos com cerca de 3.245 óbitos. Segundo as estimativas, os carcinomas de laringe correspondem a mais de 2% dos cânceres diagnosticados (www.inca.org.br). Em 2000, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, os HNSCC corresponderam a 8% dos cânceres diagnosticados (Projeto de Implantação do Registro Hospitalar RHC do HCFMUSP).

Apesar dos progressos terapêuticos na área de cuidados gerais, radioterapia e nas técnicas de reconstrução cirúrgica, a taxa de sobrevida global após 5 anos, de 25% a 70% dependendo do estadiamento e da localização ao diagnóstico, ainda está muito aquém do desejado (Muir & Weiland., 1995, Souhami & Tobias, 1998). Esta é a razão pela qual tem-se buscado definir melhores indicadores de prognóstico e de sensibilidade aos tratamentos não cirúrgicos.

Como os distúrbios proliferativos parecem ser preponderantes no processo de carcinogênese, haja vista que as populações de células cancerosas tendem a acumular com a passagem do tempo, fatores que indiquem maior ou menor capacidade proliferativa das células tumorais poderiam ser indicativos de

comportamento clínico mais ou menos agressivo (Ensley & Maciorowski, 1994, Sakr e cols., 1989 e Kearsley e cols., 1991).

Na tentativa de identificar fatores responsáveis pelo aumento de proliferação em HNSCC, mostramos em nosso trabalho de mestrado que existe uma diminuição de expressão do RNA mensageiro (mRNA) de ciclina D1 no tecido tumoral em relação à mucosa adjacente de pacientes com HNSCC (T $0,18 \pm 0,38$ vs $0,36 \pm 0,49$ N, $p=0,005$, t- teste). Outros exemplos de parâmetros ligados à proliferação celular em HNSCC, são a quantificação de células em fase de síntese de ciclo celular ou fase S (revisto por nós em Federico e cols., 1995) e a ação de fatores de crescimento com atividade antiproliferativa como o fator transformante de crescimento (TGF) β .

Em HNSCC, aumento de expressão do mRNA do TGF β foi descrita recentemente por nosso grupo, tanto em tumores da cavidade oral como de laringe (Pasini e cols., 2001). Em 1999, Hagedorn e cols. já haviam descrito aumento de TGF β tanto do mRNA, por hibridização *in situ*, como da proteína, por imunohistoquímica em carcinomas invasivos de laringe. Apesar desse aumento, existem indícios de que TGF β não estivesse sendo capaz de transmitir um sinal antiproliferativo, uma vez que esse aumento foi correlacionado com um aumento do índice proliferativo medido por Ki67.

Em células epiteliais normais, TGF β é descrito como supressor de tumor devido, por exemplo, a sua ação anti proliferativa inibindo *c-myc* ou induzindo os inibidores de cdk p15^{INK4b} e p21^{CIP1}, à sua ação pró-apoptótica ou como um regulador negativo da angiogênese. Entretanto, já é bem estabelecido que durante a carcinogênese TGF β exerce atividades tumorigênicas como o favorecimento da invasão e da motilidade celular ação e de estímulo proliferativo (revisto por

Wakefield & Roberts, 2002). Esse envolvimento complexo de TGF β nos diversos processos biológicos, gerou intensa investigação do seu mecanismo de transmissão de sinal, que se dá através da associação a receptores serina/treonina quinase transmembrânicos denominados tipo I (T β RI) e tipo II (T β RII). O receptor T β RII fosforilado recruta e ativa, ou seja, fosforila o T β RI que propaga o sinal através da ativação de Smads específicas que levam o sinal para o núcleo onde, junto com outras proteínas, controlam diretamente a transcrição de genes alvo (Dijke & Hill, 2004; figura A).

Figura A. Esquema da ativação dos receptores de TGF β - O ligante TGF β se associa primariamente aos receptores tipo II (T β RII) promovendo sua fosforilação (P). A seguir, dois receptores tipo I (T β RI) são recrutados ao complexo heterotetrâmico e são fosforilados pelo T β RII nos resíduos serino-treonina, iniciando a primeira etapa da transdução do sinal.

A ruptura da via de TGF β por perda da expressão do receptor tipo II foi descrita em vários cânceres (Kalkhoven e cols., 1995, Markowitz e cols., 1995, Norgard e cols., 1994, Park e cols., 1994, Sun e cols., 1994, Wang e cols., 1995), sendo que, a restauração da via por reexpressão do receptor, restabelece a inibição de crescimento e reverte o fenótipo maligno. A diminuição progressiva de T β RII

também foi descrita na carcinogênese oral (Paterson e cols., 2001) e de laringe (Franchi e cols., 2001), parecendo ser um evento precoce na progressão de lesões pré-cancerosas para carcinoma de célula escamosa. Além disso, a falta do receptor tipo II foi correlacionada com maior agressividade, e vice-versa, em 38 pacientes com HNSCC, indicando que diminuição da expressão do receptor tipo II nas células cancerosas poderia, pelo menos em parte, explicar a ausência de resposta à inibição de crescimento mediada por TGF β (Muro-Cacho e cols., 1999).

Além dos receptores de membrana, as vias intracelulares que transmitem o sinal de TGF β para o núcleo, e que envolve uma família de proteínas intracelulares denominada Smads, são os alvos seguintes de alterações. Essa família é composta de pelo menos 8 membros (Smads 1-8) e podem ser funcionalmente classificadas em 3 grupos: Smads ativadas pelo receptor fosforilado (R-smads), que compreende as Smads 1, 2, 3, 5 e 8; Smad co-mediadora (co-Smad) comum às diversas vias da família de TGF β , representada pela Smad 4; e Smads inibitórias (I-Smads), Smads 6 e 7, que regulam negativamente essa via (Heldin e cols., 1997, Miyazono e cols., 2000, Wrana e cols., 2000, Massague e cols., 2000). As R-Smads agem preferencialmente em vias de sinalização específicas, dessa forma, temos as Smads 1, 5 e 8 envolvidas na sinalização por BMPs e as Smads 2 e 3 que são restritas às vias de TGF β e activina. As primeiras Smads a serem fosforiladas são as R-Smads que, posteriormente, oligomerizam com a Smad 4. Esse heterocomplexo é, então, translocado para o núcleo regulando a transcrição de diversos genes alvos. Entre esses genes alvos, estão as Smads 6 e 7, que irão impedir a translocação do heterocomplexo para o núcleo e a interação da R-Smad com o T β RI, respectivamente (figura B).

Figura B. Esquema da transdução de sinal de TGFβ - Após a ativação dos receptores, as R-Smads (Smad 2 e Smad 3) são recrutadas e ativadas pelos receptores. A seguir, a Co-Smad 4 se apresenta e promove a translocação do complexo para o núcleo onde reconhecerão sítios específicos (*Smad Binding Element* – SBE) na região promotora de genes responsivos a TGFβ, promovendo sua transcrição. Exemplo de gene responsivo é a I-Smad 7 que funciona como um regulador negativo da sinalização de TGFβ.

A ausência de expressão Smads como marcador da perda de resposta antiproliferativa a TGFβ já foi abordada anteriormente. Em linhagens humanas de carcinoma de células escamosas resistentes à inibição de proliferação mediada por TGFβ, não foi detectada a forma fosforilada de Smad 2 em duas das sete linhagens tratadas com o hormônio, sendo que das demais, três não apresentaram Smad4. Portanto, em 5 das 7 linhagens de HNSCC haveria perda da resposta a TGFβ, refletida na alteração de uma das Smads (Yan e cols., 2000). Entretanto, parece não haver trabalho semelhante realizado em amostras tumorais de HNSCC.

Como o tratamento com TGF β foi descrito como capaz de induzir a transcrição de c-Jun e JunB em modelos de cultura celular *in vitro*, é possível que outro alvo da ação de TGF β nos tumores seja o complexo jun-fos ou proteína ativadora 1, (AP-1, figura C). Na verdade, o complexo AP-1 pode ser formado por elementos diversos de uma família de fatores transcricionais, da qual fazem parte a família jun (c-jun, junB e junD) e fos (c-fos, fosB, fra1 e fra2). Enquanto os membros da família Jun podem agir tanto na forma de homo como heterodímeros, os da Fos agem apenas como heterodímero. Nessas proteínas, o domínio de ligação ao DNA encontra-se na ponta N-terminal e, para que ocorra a dimerização entre essas proteínas é necessária uma região, na porção C-terminal, que possui cinco repetições de leucina, referida como “zíper de leucina”. Esse arranjo característico de domínio de ligação ao DNA e de dimerização deu a essa família o nome de “*bZIP proteins*”.

De fato, em 1999, Wong e cols. demonstraram que o tratamento de fibroblastos de embrião de camundongo HaCaT com TGF β , *in vitro*, induziu a expressão do mRNA e da proteína de c-Jun. Além disso, identificaram no promotor do gene de *c-jun* uma região de repetição CAGA, conhecida como o elemento de ligação à Smad (SBE) e, por ensaio de mobilidade em gel e de *supershift*, foi verificado que há a formação de complexos entre as Smads 3 e 4 e o promotor de *c-jun*, sugerindo que a indução de c-jun por TGF β se dê pela via das Smads. De forma semelhante, foi descrito que a ativação transcricional de junB também seria induzida por TGF β (Groot & Kruijer, 1990). Posteriormente, o mesmo grupo descreveu uma região SBE no promotor do gene de junB e, por ensaios de mobilidade em gel e de luciferase, mostraram que as Smads 3 e 4 são capazes de se ligar a essa

região e de ativar a transcrição, sugerindo que essas duas vias estejam realmente interligadas (Jonk e cols., 1998).

Figura C. Esquema representando AP-1 como alvo de TGFβ - Na literatura já foi descrita a presença de sítio SBE na região promotora de dois genes da família AP-1, *c-jun* e *junB*, e a indução desses genes por TGFβ em cultura celular. Como o complexo AP-1 também é fator transcricional, é possível que TGFβ aja sobre outros genes, como a ciclina D, indiretamente.

AP-1 tem sido associada ao controle de diversas respostas celulares a estímulos que regulam proliferação, diferenciação, resposta imune, morte celular e resposta a stress (Angel & Karin, 1991). Essa ação, no caso das proteínas da família de Jun, seria secundária à formação de dímeros estáveis com capacidade de ligar seqüências (5'TGACTCA3') do DNA, denominadas elemento de resposta ao TPA (12-O-tetradecanoate-13- acetato), ou simplesmente TRE. Como as proteínas da família Fos não formam dímeros entre si, elas se ligam ao DNA através da formação de heterodímeros com as proteínas da família jun que são mais estáveis do que

Jun:Jun. Além disso, jun forma dímeros com outras proteínas bZIP como a família ATF (fator ativador de transcrição) e se ligam a uma outra região do DNA (5'TGACGTCA3') denominada elemento de resposta ao AMPc, ou CRE (revisto por Shaulian & Karin 2001).

O envolvimento de AP-1 na proliferação é sugerido pela indução de membros da família jun e fos por estímulo mitogênico. Experimentos em animais, chamados *knock-out* e *knock-in*, nos quais um ou vários componentes de AP-1 tenham sido neutralizados, mostram a rápida indução de c-fos, fosB e fra-1 em resposta a fatores de crescimento, muito embora, fibroblastos e células tronco de embrião com ausência de uma dessas proteínas não apresentam defeitos proliferativos. Isso não ocorre em fibroblastos mutantes duplos c-fos/fos B, que apresentam proliferação lenta devido, em parte, à baixa indução de ciclina D1, sugerindo que na ausência de um, o outro exerce seu papel. c-Jun, por outro lado, parece ser indispensável para a célula como um regulador positivo do ciclo celular. Fibroblastos que não expressam c-Jun apresentam uma progressão celular deficiente e entram em senescência prematuramente *in vitro* (Mechta-Grigoriou e cols., 2001; Shaulian & Karin, 2001). Uma vez que c-jun regula a expressão de ciclina D1, um regulador positivo do ciclo celular, o defeito proliferativo induzido pela ausência de c-jun poderia ser a baixa expressão de ciclina D1. Concordando com esse fato, dados da nossa dissertação de mestrado mostraram redução na expressão do mRNA de ciclina D1 em tumores de laringe em relação à mucosa adjacente e essa diminuição ocorreu concomitante à redução de expressão do mRNA de c-jun ($r=0,89$ $p=0,02$ regressão linear) (dissertação de mestrado, Mangone FRR).

Embora junB e junD apresentem grande homologia com c-jun, estes exercem papel oposto: agem como reguladores negativos da proliferação. Assim, fibroblastos

com aumento da expressão de JunB apresentam uma redução na proliferação provocado por aumento de duração da fase G1. Esse efeito parece ocorrer em resposta ao aumento de p16^{INK4A}, que inibe a atividade de ciclina D1/cdk4/6, reduzindo a quantidade de pRb fosforilado e retardando a transição de G1 para a fase S do ciclo celular. Além disso, JunB parece antagonizar a expressão de ciclina D1 induzida por c-jun, levando a uma redução de ciclina D1 em fibroblastos com aumento de junB. Já o papel de junD na proliferação ainda não é certo mas parece ser um inibidor de proliferação, uma vez que fibroblastos imortalizados com aumento de expressão constitutiva de junD apresentam inibição de proliferação (revisto por Jochum e cols., 2001).

Resumindo, a alta expressão do mRNA de TGF β que encontramos em HNSCC (Pasini e cols., 2001) sugerem a existência de uma resistência ao sinal antiproliferativo a essa citocina, que poderia ser explicada por distúrbios envolvendo os receptores de TGF β tipo II, conforme sugerido por outros em carcinoma oral e de laringe (Franchi e cols., 2001, Paterson e cols., 2001). Outra explicação poderia ser uma falha primária na transmissão de sinal a jusante do receptor, envolvendo possivelmente a via das Smads e, talvez, membros da família AP-1 e a ciclina D. Dessa forma, o panorama da expressão das Smads e de membros específicos de AP1, poderiam ser indicadores de defeito final na via de TGF β e refletir melhor o comportamento mais ou menos agressivo desses tumores. Se isso for verdade, a expressão desses marcadores deve ocorrer em associação a parâmetros clínico-patológicos e prognóstico.

Neste trabalho, avaliamos a expressão dos mRNAs dos elementos da via de sinalização de TGF β , as Smads, e os componentes do complexo AP1 em HNSCC. Nossa intenção foi, baseado na expressão desses marcadores, traçar um perfil de

marcadores correlacionados com a presença e ausência de comprometimento linfonodal, um marcador prognóstico conhecido em HNSCC, e sobrevida global e livre de doença em pacientes portadores desse tipo de tumor.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Determinar a expressão dos RNAs mensageiros da família das Smads, Smad1 a 8, em carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço e na mucosa normal adjacente, por Ensaio de Proteção à Ribonuclease (RPA).
- Determinar a expressão dos RNAs mensageiros da família AP-1, c-jun, junB, junD, c-fos, fosB, fra-1 e fra-2, em carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço e na mucosa normal adjacente, por ensaio de Northern Blot.

Objetivos específicos

- Comparar o perfil de expressão dos RNAs mensageiros da família das Smads e do complexo AP-1
 - entre tecido tumoral e mucosa normal adjacente,
 - entre parâmetros clínico-patológicos como tamanho do tumor e comprometimento linfonodal
 - Analisar o impacto da expressão das Smads 1-8 na sobrevida global e livre de doença dos pacientes.
-

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Casuística

Neste trabalho, estudamos três populações de pacientes portadores de HNSCC: **população 1** - 90 pacientes cujas amostras de tecido foram utilizadas para o estudo da expressão dos mRNA da família das Smads por Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA) (tabela 1). **População 2** – Um subgrupo dentro da população 1, composta de 45 pacientes, utilizado para o estudo da expressão dos mRNAs dos elementos da família AP-1 por Northern Blot (tabela 2). **população 3** - 180 pacientes cujas amostras de tecido foram utilizadas no ensaio de tissue array para determinação da expressão da proteína de Fra-1 (tabela 3).

População 1

Característica	n (%)			
Idade mediana (variação)	56 (30-86)			
Estadiamento (5ª edição TNM)				
I e II	18 (19,79%)			
III e IV	73 (80,21%)			
Sítio Primário	pN0	pN+	pT1+pT2	pT3+pT4
Cavidade Oral n= 52	25 (48,1%)	27 (51,9%)	18 (34,6%)	34 (65,4%)
Laringe n=26	13 (50,0%)	13 (50,0%)	6 (23,1 %)	20 (76,9%)
Orofaringe n=8	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)
Hipofaringe n= 4	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0 (0,0%)	4 (100%)
Total n=90	41 (45,5%)	49 (54,5%)	25 (27,8%)	65 (72,2%)

Tabela 1 – Características clínico-patológicas dos pacientes portadores de HNSCC, submetidos à cirurgia terapêutica no Hospital Heliópolis, utilizados na determinação da expressão dos mRNAs da família das Smads por RPA.

População 2

Característica	n	%
Sexo		
masculino	41	91,1
feminino	4	8,9
Idade		
média	54	-
variação	30-80	-
Tamanho do Tumor		
pT1+T2	10	22,2
pT3+T4	35	77,8
Comprometimento de linfonodos		
pN0	23	51,1
pN+	22	48,9
Sítio Primário Tumor		
cavidade oral	20	44,5
laringe	19	42,2
orofaringe	06	13,3
Estadiamento (TNM 5ª edição)		
III	23	51,1
IV	22	48,9

Tabela 2– Características clínico-patológicas dos pacientes portadores de HNSCC, submetidos à cirurgia terapêutica no Hospital Heliópolis, estudados para a determinação da expressão dos mRNAs de AP-1 por Northern Blot.

População 3

Tecido	Número de casos	
Mucosa Adjacente	29	
Tumor Primário	pN0	pN+
Sítio		
cavidade oral (n=87)	39	48
laringe (n=50)	25	25
faringe (n=43)	20	23
Total	180	

Tabela 3– Características clínico-patológicas dos pacientes portadores de HNSCC, submetidos à cirurgia terapêutica no Hospital AC Camargo, estudados para a determinação da expressão da proteína de Fra-1 por tissue array.

1.1 Populações 1 e 2

Fragmentos de tecido de um total de 90 pacientes portadores de Carcinoma de Célula Escamosa de Cabeça e Pescoço submetidos a cirurgia terapêutica no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, São Paulo, foram incluídos nesta parte do estudo.

As amostras de tecido foram coletadas durante o ato operatório, no período de outubro de 1999 a outubro de 2003, dissecadas a fresco e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente encaminhadas para o laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. No laboratório, estes tumores foram catalogados em um banco de dados contendo todas as informações clínicas e terapêuticas dos pacientes, e as informações sobre a evolução do tratamento foram atualizadas periodicamente. Para as análises de sobrevida, foi utilizada a planilha com atualização de dados em Abril de 2004. As características dos pacientes podem ser observadas nas tabelas 1 e 2.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº450/99). A coleta de amostras acima descrita só foi realizada naqueles pacientes, que após serem esclarecidos quanto aos procedimentos, concordaram em participar assinando o termo de consentimento informado. Só foram incluídos na pesquisa pacientes sem tratamento prévio.

1.2 População 3

Para o ensaio de *Tissue Array*, foram avaliados, retrospectivamente, um total de 180 casos de HNSCC de pacientes tratados e operados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer AC Camargo. Os blocos de parafina foram selecionados retrospectivamente dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer AC Camargo. As amostras incluíram 87 casos de carcinoma da cavidade oral (39 pN0 e 48 pN+), 50 tumores de laringe (25 pN0 e 25 pN+) e 43 tumores de faringe (20 pN0 e 23 pN+). Foram incluídas também 29 amostras de mucosa adjacente ao tumor.

2.Extração do RNA total

Para a extração, cada tecido foi pulverizado com o aparelho Termovac (Technolab Corporation), sendo sempre mantido congelado em Nitrogênio líquido. Posteriormente, aproximadamente 100 mg deste tecido pulverizado foi transferido para um tubo de 1,7 mL contendo 1 mL de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies), homogeneizado por inversão e incubado por 10 minutos (min) em temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteínas. Nesta etapa, o volume da amostra não deve exceder 10% do volume do reagente.

Após, centrifugação a 12000g, 15 min a 4°C, a fase líquida foi transferida para um novo tubo de 1,7 mL contendo 0,2 mL de clorofórmio para cada 1mL do reagente de TRIzol®, este tubo foi vortexado por 15 segundos e incubado de 2 a 3 min em temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 15 min a 4°C. Dessa forma, a mistura foi separada em uma fase inferior,

fenólica, e uma fase superior aquosa, contendo o RNA. O volume da fase aquosa deve ser aproximadamente 60% do volume do TRIzol® usado para homogeneização. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool Isopropílico para a precipitação do RNA. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 10 min ou a -20°C por até duas horas (h). Após nova centrifugação a 12000 g por 10 min a 4°C , o sobrenadante foi desprezado, preservando-se o precipitado de RNA.

Posteriormente, o RNA foi lavado com 1 mL de Etanol 75%, vortexado e centrifugado a 7500 g por 15 min a 4°C . Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco com auxílio de uma ponteira estéril ligada à bomba a vácuo. Em seguida, o RNA foi dissolvido em aproximadamente 20-40 μL de água dietilpirocarbonato (DEPC), dependendo do tamanho do precipitado.

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 e 280 nm e a integridade do material foi verificada em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo do material foi verificada em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo

3. Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA)

O ensaio de Proteção da Ribonuclease (*PharMingen RiboQuant™ Multi-Probe RNase Protection Assay*) consiste, basicamente, na síntese de mRNA *antisense* marcados com UTP[$\alpha^{32}\text{P}$] que servem como sondas para detecção de mRNA específicos. Essa sonda é sintetizada em um sistema de transcrição *in vitro*

utilizando como molde fragmentos das seqüências dos mRNA de interesse, cada qual com um tamanho distinto, clonados em um plasmídeo contendo o sítio de ligação da *T7 RNA polimerase*. Dessa forma, cada produto da transcrição terá um tamanho característico, diferente do outro. O conjunto de sondas é hibridizado ao RNA total da amostra de interesse, sendo essa reação seguida da ação de uma RNase que quebrará todos o RNA de fita simples mantendo intactos aqueles que estiverem ligados às seqüências complementares. Esses RNAs restantes, protegidos da Rnase, são purificados, aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida. Um filme de raioX é exposto a esse gel e o sinal gerado é quantificado em um densitômetro. A quantificação de cada tipo de RNA na amostra de RNA original é realizada baseada na intensidade do fragmento de sonda protegido, do tamanho apropriado.

3.1. Síntese das sondas

Para a síntese das sondas os seguintes reagentes foram adicionados, nesta ordem, em um tubo de 1,5 mL,: 1µL *Rnasin* (40U/µL), 1 µL de uma mistura de nucleotídeos GACU (CTP, ATP, GTP (2,5 mM) e UTP (61 µM)), 2 µL de DTT (Dietiltreitol 100mM), 4µL de tampão de transcrição 5X, 1µL da mistura de moldes de RNA de interesse, 10 µL de [α -³²P]UTP, 1µL RNA polimerase T7 (20 U/µL). Após suave agitação com auxílio de uma pipeta e uma rápida centrifugação, a mistura foi incubada a 37°C por 1h. A reação foi finalizada com a adição de 2 µL de *Dnase/Rnase-free* (1 U/µL), quando então a mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada a 37°C por 30 min.

Ao tubo, foram adicionados em ordem: 26 µL de EDTA 20 mM, 25µL de fenol saturado com Tris-HCl, 25µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1), 2µL de RNA

transportador (RNAt) de levedura (2mg/mL), seguido de uma agitação vigorosa em um vortex e de uma centrifugação por 5 min a temperatura ambiente. A fase aquosa superficial foi transferida para um novo tubo de 1,5mL ao qual adicionou-se 50µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1). Após homogeneização em um vortex e centrifugação por 2 min a temperatura ambiente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5mL ao qual adicionaram-se 50 µL de acetato de amônio 4 M e 250 µL de etanol 100% gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 30 min a -70°C. Após, os tubos foram centrifugados por 15 min a 4°C e o sobrenadante cuidadosamente retirado. Ao precipitado foram adicionados 100 µL de etanol 90% gelado e submetido a nova centrifugação por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado permaneceu a temperatura ambiente de 5 a 10 min para secagem. O precipitado foi ressuspendido em 50 µL de tampão de hibridização, rapidamente centrifugado e uma alíquota de 1 µL foi retirada, em duplicata, e para quantificação da marcação em um contador de radiação beta. As sondas podem ser mantidas a -20°C e, geralmente, podem ser usadas por duas hibridizações sucessivas.

3.2. Preparação do RNA e hibridização

Para os ensaios de hibridização, foram utilizados 10 µg do RNA total de cada uma das amostras de interesse que foram alíquotadas cada qual em um tubo de 1,5 mL. Foi utilizado também um tubo contendo RNAt de levedura como controle negativo da reação. Como controle positivo do ensaio, foi utilizado 2 µg do RNA controle PharMingen. Não se aconselha trabalhar com mais do que 20-24 tubos de amostras para cada RPA.

As amostras de RNA foram precipitadas, secas e ressuspendidas, com auxílio de um vortex, em 8 μL do tampão de hibridização. As sondas foram diluídas para concentração apropriada, conforme as indicações do fabricante. A cada amostra de RNA foram adicionados 2 μL da sonda diluída e suavemente homogeneizados com pipeta. Para evitar a evaporação, foram adicionados 50 μL de óleo mineral em cada tubo. Os tubos contendo as amostras foram transferidos para um banho-seco pré-aquecido a 90°C que foi submetido a uma redução lenta da temperatura até 56°C por 12-16 hs.

3.3. Tratamentos com RNase

Antes de proceder com o tratamento com RNase, as amostras foram submetidas a uma redução gradativa da temperatura até 37°C por 15 min. Após esse período, foi adicionado, sob o óleo mineral, 100 μL de uma solução de RNase [2,5 mL de tampão de RNase 6 μL de Rnase A + T1 (A:80 ng/ μL ; T1:250 U/ μL) volume para 20 amostras] e os tubos foram submetidos a uma centrifugação por 10 segundos e incubados por 45 min a 30°C.

À parte, em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 18 μL de uma solução fresca de proteinase K (390 μL de tampão de proteinase K, 30 μL de proteinase K 10 mg/mL, 30 μL de RNAt de levedura, para 20 amostras). Com um pipetador, a fase inferior da reação de RNase foi transferida para o tubo a solução de proteinase K, homogeneizada em vortex e centrifugada. A reação ocorreu a 37°C por 15 min. A esse tubo, foram adicionados 65 μL de fenol saturado em Tris e 65 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1) e, após homogeneização vigorosa, foi submetido a centrifugação por 5 min à temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 120 μL de acetato de amônio 4 M e 650 μL de etanol

100% gelado. Após homogeneização por inversão, a mistura foi incubada por 30 min a -70°C e centrifugada por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 100 μL de etanol 90% gelado. Depois de uma nova centrifugação de 5 min a 4°C , o sobrenadante foi desprezado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Antes de aplicar as amostras no gel, o material foi ressuspensionado em 5 μL de tampão de amostra 1X com auxílio de um vortex e mantidos por 3 min a 90°C sendo posteriormente, mantidos em gelo até a aplicação.

3.4. Resolução em gel das sondas protegidas

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de aproximadamente 40 cm de altura e 0,4 mm de espessura. As placas de vidro utilizadas como molde foram devidamente limpas e siliconizadas antes da montagem do aparato para polimerização do gel. Para este ensaio, utilizou-se um gel de acrilamida com concentração final de 5%, para tal foram necessários os seguintes reagentes: 74,5 mL de solução de acrilamida (19:1 acrilamida/bis): 8,85 mL de acrilamida 40%, 9,31 mL de bisacrilamida 2%, 7,45 mL de TBE 10X, 35,82 g de uréia, dH_2O q.s.p. 74,5 mL, 450 μL de persulfato de amônio 10%, 60 μL de TEMED. A solução foi imediatamente aplicada dentro do molde e todas as bolhas de ar foram removidas, ao término da aplicação, um pente de 5mm de largura foi colocado para formação dos poços de aplicação. Após a polimerização (cerca de 1 h) foi realizada uma pré-corrida em tampão TBE 0,5X em força constante de 40 V por pelo menos 45 min.

Após esse período, as amostras foram aplicadas sendo que em uma das canaletas, foi aplicada a sonda diluída em solução de hibridização para uma concentração de 1000-2000 cpm que serve como marcador de peso molecular. As amostras migraram no gel até que o corante azul de bromofenol alcançasse 30 cm,

em força constante de 50 V. Então, o aparato do gel foi desmontado, a placa menor removida e um papel filtro 3M foi colocado sobre o gel. Para secagem do gel, a montagem foi envolta em filme de plástico e transferida para o secador de gel onde permaneceu por 1h a uma temperatura de 80°C. Posteriormente, um filme de Raio-X, Kodak X-AR, foi exposto a esse gel em um chassis com tela intensificadora e mantido a -70°C por um período de 24 h.

A identificação das bandas correspondentes aos RNAs protegidos foi possível através da plotagem das distâncias entre elas em papel gráfico semi-log que fornece uma curva padrão de distância de migração *versus* log do comprimento de nucleotídeo, conforme as instruções dos fabricantes. É importante observar que o comprimento das sondas foi maior do que o dos fragmentos protegidos devido à presença de sequências flanqueadoras nas sondas derivadas dos plasmídeos, que não hibridizam com o mRNA alvo. As bandas impressionadas no autoradiograma foram quantificadas em um densitômetro e expressas segundo o conteúdo de L32 presente na mesma amostra.

4. Northern Blot

4.1. Gel de Agarose

O gel de agarose foi preparado dissolvendo-se 1,3 g de agarose em 127 mL de água, ao qual foi adicionado 14 mL de tampão MOPS 10X [ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico, (Sigma)] 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM pH 7,0 (Merck), e, sob agitação, 6,0 mL de formaldeído 37% (Merck). A solução foi despejada em uma placa de vidro horizontal (11 x 14 cm), contendo um pente com

dentos de 2 mm de espessura para formação dos poços de aplicação, e deixada para esfriar a temperatura ambiente, por aproximadamente 30 min.

4.2. Preparação das amostras de RNA

As amostras foram preparadas ajustando-se uma concentração de 20 µg de RNA total para 5 µL em água. Acrescentou-se à amostra, 25 µL de tampão para RNA [750 µL de formamida deionizada (Sigma), 150 µL de tampão MOPS 10x, 240 µL de formaldeído, 100 µL de água, 100 µL de glicerol (Difco), 80 µL de azul de bromofenol (10% peso/volume)] e a solução foi aquecida a 65°C por 15 min. Antes da aplicação, adicionou-se 1 µL de brometo de etídeo 1,0 mg/mL (Sigma).

4.3. Eletroforese e Transferência do RNA total para membrana de Nylon

As amostras foram aplicadas no gel e a eletroforese foi realizada em cuba contendo tampão de corrida MOPS 1X sob agitação a uma força constante de 60V por 4 a 5 hs, à temperatura ambiente.

Terminada a eletroforese, o RNA foi visualizado diretamente sobre um transluminador de luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 254 nm e fotografado (Image Máster – Amersham Pharmacia). O corante brometo de etídeo presente na amostra emite fluorescência laranja quando exposto à radiação UV.

Antes da transferência das amostras para membrana, o gel foi lavado em 3 seqüências de 15 min cada, sendo a primeira em água e as demais em SSC 2X (SSC 20X solução estoque: NaCl 3,0 M; citrato de sódio 0,3 M pH 7,0). A membrana de nylon marca Hybond-N (Amersham International, Buckinghamshire, Inglaterra) foi colocada em água por no mínimo 30 min para saturação e, posteriormente, em

solução 5X SSC para atingir a mesma concentração do gel no momento da transferência.

A transferência foi realizada em um sistema a vácuo (Vácuo Dine da Pharmacia). O gel foi colocado sobre a membrana e as bolhas existentes entre ambos foram retiradas pressionando-se um bastão de vidro sobre a montagem. O vácuo foi ligado, e deu-se a transferência em quatro seqüências com duração de 15 min cada, sendo as duas primeiras com solução 5X SSC e as outras duas com 10X SSC, trocando-se as soluções entre as etapas.

A membrana foi retirada do sistema, lavada em 2X SSC para retirada de resíduos de agarose e seca a temperatura ambiente. Posteriormente, o RNA foi fixado à membrana por exposição à radiação UV no comprimento de onda de 254 nm por 3 min cada lado. A membrana foi devidamente identificada e foi marcada a localização das “bandas” dos RNA ribossomais (RNAr) 28S e 18S.

4.4. Síntese da sonda

Este procedimento foi realizado em capela com anteparos de acrílico.

A síntese da sonda radioativa foi realizada utilizando o *kit* de marcação *Red-prime DNA labeling system* (Amersham Corp., Amersham, UK) com [α - 32 P]dCTP (Amersham Corp., Amersham, UK) segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, ferveu-se 50ng de cDNA em 45 μ L de TE por 10 min. Após, esse volume foi transferido para um tubo contendo uma mistura de dNTPs, *klenow* e *random primers*, e incubado a 37°C por no mínimo 10 min. Após a marcação, uma alíquota de 2 μ L foi retirada da amostra e colocada em um tubo de cintilação contendo 5 mL de aquasol [1 L de Triton X-100 (Merck), 0,6 g de POPOP (Sigma),

12,0 g de PPO (Sigma) e 2 L de Tolueno (Merck)]. Realizou-se a contagem da radioatividade total deste volume em um contador de cintilação LS-5000, Beckman.

Após o término da marcação, efetuou-se a monitoração da radioatividade no local com um aparelho Geiger.

4.5. Hibridização da membrana de nylon com a sonda radioativa

Resumidamente, as membranas foram colocadas em cilindros de vidro e pré-hibridizadas no forno de hibridização (Techine) por no mínimo 30 min a 42°C em 20 mL de solução de hibridização [5X SSPE (NaCl 0,75 M; NaH₂PO₄ 0,05 M; EDTA 4 mM pH7,4), 5X Denhardt's (Ficoll 400 0,05 g/mL, polivinilpirolidona 0,05 g/mL; soroalbumina bovina 0,05 g/mL), SDS 1% (lauril sulfato de sódio), 200 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado e água]. Para a hibridização, aproximadamente 2x10⁶ cpm/mL da sonda foi fervida por 10 min e adicionada à solução. O tempo de incubação da hibridização foi de aproximadamente 16 hs a 42°C. Após esse período, os filtros foram lavados duas vezes com solução 2x SSPE + 0,1% SDS a temperatura ambiente e duas vezes com 1x SSPE + 0,1% SDS, uma a 52°C e outra a temperatura ambiente.

Após as etapas de lavagem, retirou-se a umidade excessiva das membranas colocando-as entre folhas de papel de filtro e, em seguida, foram seladas em saco plástico. Posteriormente, o filme de Raio X-OMAT XK-1 100SH (Kodak Diag. Films, São Paulo, SP, Brasil) foi exposto à membrana dentro de um chasis contendo um par de intensificador de imagem. O chasis foi deixado no freezer à temperatura de -70°C por um período médio de cinco dias quando então, foi revelado.

4.6. Recuperação da membrana

Conforme as recomendações prévias do fabricante, para o sucesso da remoção da sonda, nunca deixar as membranas secar totalmente após hibridização e lavagem.

Para remoção total das sondas hibridizadas, as membranas foram lavadas duas vezes em SDS 0,1% a 96°C por 20 min e depois mantidas a temperatura ambiente até esfriar a solução. Após esse período, o excesso de umidade foi retirado com papel filtro e as membranas seladas em sacos plásticos e estocadas em freezer -20°C até o momento do próximo uso.

4.7. cDNAs utilizados

As seqüências de cDNAs utilizadas na síntese das sondas radioativas foram sintetizadas a partir de um ensaio de RT-PCR, clonagem e sequenciamento. Como molde para a reação de RT-PCR utilizamos o RNA total extraído da linhagem celular derivada de carcinoma de mama ductal invasivo, MDA-MB231, por expressar grandes quantidades de todos os membros da família AP-1.

4.7.1. Transcrição Reversa (RT) - Obtenção do cDNA

Para a transcrição reversa, foram utilizados aproximadamente 5 µg de RNA total. Ao RNA foram adicionados 2,5 µL de *Random Hexamers* 0,5 µg/ µL e a mistura foi incubada a 70°C por 10 min para desnaturação das fitas. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 segundos, incubado novamente por 2 min no gelo e foi adicionado 8 µL de uma mistura contendo: 4 µL de 5X tampão *Super Script II* (Invitrogen Life Technologies), 2 µL de dNTPs 200µM (desoxirribonucleosídeos

trifosfatados), 0,5 µL de *Super Script II* 5UI/µL (Invitrogen Life Technologies), 1 µL de DTT (dietiltreitol) 0,1 M e 0,5 µL de água. Posteriormente, o material foi incubado a 42°C por uma hora para que haja a reação de síntese das fitas de cDNA. A reação foi inativada a 70°C por 15 min e armazenado no freezer a -20°C.

4.7.2. Reação de Polimerase em Cadeia -PCR

Para a reação de PCR, foram utilizados de 100 a 200 ng de cDNA, 0,5 µL dNTPs 10 µM, 2,0 µL de tampão da *Taq polimerase* 10X, 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,3 µL de *Taq polimerase* (Invitrogen Life Technologies), 0,3 µL de *primer sense* 10 µM, 0,3 µL de *primer antisense* 10 µM e água em quantidade suficiente para 20 µL. A sequência 5'→3' dos *primers sense e antisense* utilizados estão descritos na tabela 4:

	Sense	Anti-sense
c-Jun	AGG AGG AGC CTC AGA CAG TG	TGT TTA AGC TGT GCC ACC TG
JunB	ACT CTT TAG AGA CTA AGT GCG	GAA ACA GAC TCG ATT CAT A
JunD	GAG TGT TCG ATT CTG CCC TA	TGT GGA CTC GTA GCA AAC AA
c-Fos	ATC TGT GCG TGA AAC ACA	TCC AGC ACC AGG TTA ATT CC
FosB	ACC CTT TTC TGA TCG TCT CG	CTG CTC ACA CTC ACA CTC G
Fra-1	GCC TGT GCT TGA ACC TGA G	GCT GCT ACT CTT GCG ATG A
Fra-2	CCC AGT GTG CAA GAT TAG CC	CCC AGT GTG CAA GAT TAG CC
β actina	CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC	CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T

Tabela 4: Sequência dos primers sense e anti-sense utilizados nas reações de PCR. Os primers foram desenhados utilizando o Primer3 Software <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3> e a especificidade (homologia) foi verificada pelo BLASTn <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: temperatura inicial de 95°C por 5 min para desnaturação das fitas; 30 ciclos de 95°C por 1 min, 54°C

por 1 min para pareamento dos *primers* às fitas de cDNA e 72°C por 1 min para extensão das novas fitas; uma temperatura de 72°C por 10 min a fim de estender possíveis fragmentos incompletos; e ao final foi mantido a 4°C. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% contendo 4 µl de brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Após a corrida, a uma voltagem constante de 45 volts o gel foi rapidamente visualizado em luz UV e fotografado. Com o auxílio da luz UV, as bandas correspondentes aos produtos amplificados foram cortadas, purificadas do gel de agarose e eluídas com auxílio do *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies) segundo as instruções do fabricante.

4.7.2. Clonagem e sequenciamento

Quatro microlitros do DNA purificado foram ligados a 10 ng do DNA plasmideal pCR®4-TOPO (Invitrogen) na presença de NaCl 0,2 M e MgCl₂ 0,01 M durante 10 min a 37°C. Para transformação de bactéria DH5α-T1® (Invitrogen) quimiocompetentes, 4 µL do produto de ligação foi incubado com 50 µL de bactéria em gelo durante 20 min, seguido de um choque térmico transferindo as células para banho a 42°C por 30 segundos e de volta no gelo por mais 2 min. Posteriormente, adicionamos 250 µL de meio SOC (triptona 2%, Extrato de levedo 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicose 20 mM) e incubamos a 37°C por 1h com agitação de 200 rpm. Após centrifugação por 2 min a 0,8 g, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em aproximadamente 50 µL de meio, que foram esgotados em placa contendo meio de cultura LB [5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de triptona (Interlab Distribuidora de Produtos Científicos, São Paulo, Brasil) e 5 g/L de NaCl pH 7,2] mais 15% de bacto/ágar (Interlab Distribuidora de Produtos Científicos, São Paulo, Brasil),

contendo o ampicilina 100 µg/mL. As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por 16hs.

Pelo menos quatro colônias isoladas foram semeadas em 3 mL de meio LB com 100 µg/mL ampicilina e mantidos por 14 hs à 37°C com agitação de 200 rpm. Após esse período, uma alíquota de 500 µL foi congelada em glicerol 30% a -70°C. Do volume de bactéria restante, foi extraído o DNA plasmideal com o auxílio do *Kit Concert Rapid Plasmid Purification Systems* (Life Technologies). Este *kit* utiliza uma solução alcalina/SDS que fornece um lisado contendo plasmídeos com mínimas quantidades de ácido nucléico genômico (Birnboim & Doly, 1979). Este lisado é aplicado a uma mini-coluna que contém uma membrana de sílica onde o DNA plasmideal é seletivamente absorvido (Vogelstein e Gillespie, 1979).

Após extração, o DNA plasmideal foi digerido com a enzima de restrição *Eco RI*, que flanqueia o sítio de clonagem do plasmídeo, para verificar a presença do inserto. O produto desta digestão foi analisado em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X (Tris-base 0,09 M, ácido bórico 0,09 M e EDTA 2 mM - pH 8,0). As amostras foram comparadas ao padrão de peso molecular 100bp (Invitrogen) para verificar se o tamanho do inserto coincidia ao tamanho esperado. Pelo menos dois plasmídeos positivos para a presença do inserto com o tamanho esperado foram seqüenciados (*Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing MegaBace*, Amershan/Pharmacia) para confirmação da seqüência.

4.7.3. Isolamento do cDNA

Uma alíquota das bactérias congeladas transformadas com vetores contendo os cDNAs da família AP-1 foram expandidas em 3 mL de LB mais o antibiótico

selecionador, à 37°C, por 14 hs. As bactérias foram recuperadas por centrifugação e o DNA plamideal foi extraído conforme descrito anteriormente. Os insertos foram obtidos através da digestão dos plasmídeos com *Eco RI*. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose, os insertos foram cortados e purificados da agarose com o kit *Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies).

Para detecção do RNAr 18S foi utilizado o cDNA (1,9kb clonado no sítio *Sal I/Eco RI* do plasmídeo pBR322i) gentilmente cedido pelo Dr. Arnhein, Department of Biochemistry, State University of New York, EUA ([Arnhein e cols.,1979](#))

5. PCR Semi-quantitativa

A expressão do mRNA de JunB foi determinada por RT-PCR semiquantitativa. Para isso, 5 µg de RNA total obtido das amostras de tecido, foram tratados com 1 U de *DNase-RNase free* (Promega, Madison, WI, USA), 10 mM MgCl₂ e 1 mM DTT em um volume final de 100 µL de TE pH 7,4, por 10 min a 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de uma mistura contendo 100 mM EDTA, 3 M acetado de sódio e SDS 2% seguido de uma extração com fenol-cloroformio e precipitação com etanol. A reação de transcrição reversa e a PCR foram realizadas conforme descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2. Para determinação do ciclo onde havia crescimento linear de amplificação dos cDNA, as reações foram interrompidas no 29º, 32º, 35º e 38º ciclos para JunB e nos 17º, 20º, 23º, 26º e 29º ciclos para β actina. Após padronização, foram estabelecidos 35 e 25 ciclos de amplificação para Jun B e β actina, respectivamente.

6. Tissue Array

A seleção dos blocos, a montagem e leitura das lâminas e a análise dos resultados foi realizada pelo grupo de patologia do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer sob supervisão do Prof Dr Fernando Augusto Soares.

6.1. Construção da lâmina

As lâminas originais foram coradas com Hematoxilina-eosina e reavaliadas selecionando-se as áreas mais representativas do tumor ou mucosa normal, com posterior marcação das mesmas nos respectivos blocos de parafina. Dois cilindros de 0,6 mm de cada amostra foram obtidos dos blocos de parafina e introduzidos em um novo bloco de parafina utilizando-se um instrumento de precisão (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). O bloco “receptor” foi então gentilmente aquecido e sua face precionada contra uma superfície plana para trazer os cilindros para o mesmo plano. A primeira lâmina obtida a partir do bloco receptor foi corada pela hematoxilina-eosina. Novas lâminas com cortes de 4 µm foram confeccionadas até o esgotamento do tecido presente no bloco.

6.2. Imunohistoquímica

Para o estudo imunohistoquímico de Fra-1, foram utilizadas 3 lâminas não consecutivas havendo, portanto, um total de seis amostras de diferentes pontos dos tumores e das mucosas para a análise. A avaliação imunohistoquímica foi realizada utilizando-se procedimento padrão. Recuperação antigênica pelo calor foi realizada

utilizando-se panela de pressão. O ensaio foi realizado com o anticorpo policlonal contra Fra-1 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA) na diluição 1:100 e a reação foi visualizada utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina como substrato cromógeno.

6.3. Avaliação imunohistoquímica

A expressão de Fra-1 foi considerada positiva quando a marcação foi visualizada em mais de 10% das células na secção de um dos cilindros. A classificação final de um caso quanto a positividade de Fra-1 foi feita após o cruzamento dos dados referentes a cada um dos seis cilindros disponíveis. Considerou-se positivo o caso em que a marcação de Fra-1 foi detectada em pelo menos um dos cilindros avaliados. O padrão de marcação (nuclear, citoplasmático, membrana ou a combinação de mais de um destes) foi identificado. Não foi observada variação significativa de intensidade de marcação entre os casos.

7. Métodos Estatísticos

Os valores densitométricos dos mRNAs de AP-1 e das Smads 1-8, em tumor e tecido normal, foram comparadas pelo t-teste. Os pacientes foram categorizados como positivos ou negativos para cada marcador, segundo o valor da expressão densitométrica, se acima ou abaixo da mediana do grupo tumor. O tempo de seguimento variou de 0,23 a 43,27 meses, mediana de 11,03 meses. As curvas de sobrevivência foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier para cada um dos parâmetros analisados e os subgrupos prognósticos comparados pelo teste de Log

Rank, usando para isso o programa SPSS 10.0. Os pacientes que permaneciam vivos na última consulta ou com perda de seguimento foram considerados censurados. Para análise multivariada de Cox, foram incluídos no modelo os seguintes parâmetros: status nodal, se positivos (pN +) ou negativos (pN -), e as Smads que apresentaram resultados significativos ou marginalmente significativos na análise univariada de sobrevida.

RESULTADOS

Smad

Em um trabalho anterior (Walder, Tese de Doutorado) realizado por nosso grupo em um total de 27 pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral, observamos que em geral a expressão das Smads estavam aumentadas no tumor quando comparadas à mucosa adjacente normal. Quando esses pacientes foram agrupados quanto a características anátomo-patológicas, essas diferenças puderam ser observadas nos grupos de pior prognóstico. Uma associação entre a expressão positiva de Smad 6 e sobrevida global dos pacientes também foi encontrada (Log Rank = 0,001). A partir desses achados pensamos em ampliar nossa casuística e verificar se esse comportamento também seria observado em HNSCC de outros sítios primários.

Nesta etapa do trabalho, analisamos a expressão dos mRNAs da família das Smads em fragmentos de tecido de 90 tumores e 71 mucosas adjacentes provenientes de pacientes portadores de HNSCC (tabela 1).

A expressão de cada transcrito foi detectada por RPA, e a expressão relativa a cada Smad foi calculada como a razão entre o valor densitométrico de cada Smad e do L32 correspondente (figura 1). A expressão de Smad 1 foi observada em 95,5% das amostras tumorais variando de 0 a 0,29, Smad 2 em 95,5% (0-0,38), Smad 3 em 96,7% (0-0,52), Smad 4 em 95,5% (0-0,33), Smad 5 em 96,7% (0-0,27), Smad 6 em 70% (0-0,25), Smad 7 em 96,7% (0-0,25), Smad 8 em 53,3% (0-0,14). A variação e a mediana de expressão dos mRNAs das Smads estão representadas na figura 2.

Figura 1 – Expressão de Smads 1-8 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço através do ensaio de RPA.

Amostras de RNA total, extraídas de fragmentos de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes com HNSCC foram obtidos e processados como descrito em material e métodos. Na primeira coluna temos a amostra da sonda de RNA transcrito “*in vitro*” que não foi submetido à ação de RNase. As colunas seguintes correspondem a pares de tumor (T) e tecido normal (N) que foram submetidos à hibridização e ação de RNase. Na ultima coluna encontra-se o controle interno positivo do *kit* RPA. A expressão de cada mensageiro foi determinada levando em conta a densitometria das bandas específicas relativa à densitometria da banda L32, usada como fator de normalização.

A análise pareada dos valores relativos à expressão das Smads (n=66) revelou que a média de expressão é maior nos tumores quando comparado à mucosa adjacente para todas as Smads, exceto para Smad 8 (Smad 1 $p=0,008$; Smad 2 $p=0,001$; Smad 3 $p<0,0001$; Smad 4 $p=0,03$; Smad 5 $p=0,001$; Smad 6 $p=0,014$; Smad 7 $p<0,0001$; Smad 8 $p=0,07$ t-teste). Os valores das médias e desvios padrão estão representados na Figura 3. Em seguida, análise semelhante foi realizada, subdividindo os pacientes quanto ao tamanho do tumor primário e presença de invasão linfonodal: pT1/pT2 (n=18) e pT3/pT4 (n=48); pN0 (n=29) e pN+ (n=37), os resultados detalhados podem ser observados na figura 4.

Figure 2. Análise de Boxplot representando a expressão dos mRNA das Smads 1-8 expressos em relação ao mRNA de L32 em HNSCC e mucosa normal adjacente. *Caixas*, 25%, 50% e 75%; *barras*, 10% e 90%; °, valores acima dentro do limite de 1.5 a-3 x o limite do quartil superior ; * valores acima de 3 x o quartil superior.

A comparação da expressão das Smads entre os tumores pN0 e pN+ revelou que somente Smad 1 (pN0 $0,05 \pm 0,05$ vs $0,07 \pm 0,10$ pN+; $p=0,04$) e Smad 3 (pN0 $0,12 \pm 0,09$ vs $0,17 \pm 0,11$ pN+; $p=0,01$) estavam superexpressas nos tumores pN+ e a Smad 4 (pN0 $0,11 \pm 0,08$ vs $0,14 \pm 0,09$ pN+; $p=0,10$) e a Smad 5 (pN0 $0,08 \pm 0,05$ vs $0,10 \pm 0,07$ pN+; $p=0,07$) apresentaram uma tendência a esse aumento. Em relação ao tamanho do tumor, nenhuma diferença foi detectada entre os tumores pT1/T2 e pT3/T4.

Figura 3 – Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC e mucosa adjacente. A- Média e desvio padrão relativo a expressão de cada Smad nos tumores e na mucosa. Sig - resultado da comparação da expressão de cada Smad entre os dois grupos. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. **B-** Representação gráfica da média e desvio padrão relativa a expressão de cada Smad. ■ tumor ■ mucosa normal adjacente

Embora o tipo celular dos HNSCC seja o mesmo, a resposta ao tratamento e/ou a evolução do tumor varia muito conforme sua localização primária. Assim, o próximo passo foi avaliar o perfil de expressão das Smads segundo o sítio primário do tumor. Devido ao tamanho da amostra, para esta etapa foram considerados apenas os tumores da cavidade oral (n=52) e da laringe (n=26).

Nos tumores da cavidade oral como um todo a expressão de Smad 1 variou de 0,01 a 0,16 (mediana: 0,04); Smad 2 de 0 a 0,38 (mediana: 0,12), Smad 3 de 0 a 0,39 (mediana: 0,13); Smad 4 de 0 a 0,32 (mediana: 0,11); Smad 5 0 a 0,20 (mediana: 0,09); Smad 6 de 0 a 0,25 (mediana: 0,03); Smad 7 de 0 a 0,25 (mediana: 0,07); e Smad 8 de 0 a 0,14 (mediana: 0,05). A comparação da expressão das Smads (n=43) mostrou que os tumores expressam mais Smad 2 ($p=0,008$), Smad 3

($p=0,02$), Smad 5 ($p=0,009$) e Smad 7 ($p<0,0001$), enquanto que, em relação às Smads 1 ($p=0,11$), Smad 6 ($p=0,06$) e Smad 8 ($p=0,11$), apenas uma tendência ao aumento de expressão foi observada em relação à mucosa (figura 5).

Figura 4 - Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC e mucosa adjacente. A e B- Representação gráfica da média e desvio padrão relativa a expressão de cada Smad segundo tamanho do tumor e estatus linfonodal, respectivamente. **C e D-** Média e desvio padrão relativa a expressão de cada Smad nos tumores e na mucosa. Sig - resultado da comparação da expressão de cada Smad entre os dois grupos. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. ■ tumor ■ mucosa normal adjacente

Figura 5 - Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC da cavidade oral e mucosa adjacente. **A-** Média e desvio padrão relativo a expressão de cada Smad nos tumores e na mucosa. Sig - resultado da comparação da expressão de cada Smad entre os dois grupos. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. **B-** Representação gráfica da média e desvio padrão relativa a expressão de cada Smad. ■ tumor ■ mucosa normal adjacente

Subdividindo os pacientes quanto ao tamanho do tumor, vimos que nos tumores pT1/T2 (n=14) somente a Smad 5 (p=0.05) estava aumentada nos tumores enquanto que nos pT3/T4 (n=29) as Smads 2 (p=0.02), Smad 3 (p=0.05), Smad 5 (p=0,05) e Smad 7 (p<0,0001) estavam aumentadas nos tumores quando comparada a mucosa (Figura 6A, 6C). Nos tumores pN0 (n=20) somente Smad 7 (p=0,02) estava superexpressa nos tumores e as Smads 3 (p=0,110), Smad 5 (p=0,06) e Smad 6 (p=0,06) apresentaram uma tendência a esse aumento. No grupo de pacientes com comprometimento linfonodal (n=20) as Smads 1 (p=0,05), Smad 2 (p=0,01) e Smad 7 (p<0,0001) estavam com expressão aumentada em relação à mucosa. As Smad 3 (p=0,11) e Smad 5 (p=0,08) apresentaram um aumento de expressão marginalmente significativo (Figura 6B, 6D). A comparação das médias de expressão das Smads entre os grupos pT1/T2 vs pT3/T4 e pN0 vs pN+ não mostrou nenhuma diferença significativa.

Figura 6- Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC da cavidade oral e mucosa adjacente. A e B- Representação gráfica da média e desvio padrão relativa a expressão de cada Smad segundo tamanho do tumor e estatus linfonodal, respectivamente. **C e D-** Média e desvio padrão relativo a expressão de cada Smad nos tumores e na mucosa. Sig - resultado da comparação da expressão de cada Smad entre os dois grupos. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. ■ tumor ■ mucosa normal adjacente

Nos tumores de laringe como um todo a expressão de Smad 1 variou de 0 a 0,18 (mediana:0,07); Smad 2 de 0,02 a 0,34 (mediana:0,14); Smad 3 de 0,03 a 0,52 (mediana:0,16); Smad 4 de 0,02 a 0,33 (mediana:0,13); Smad 5 de 0,01 a 0,27 (mediana:0,10); Smad 6 de 0 a 0,12 (mediana:0,01); Smad 7 de 0,02 a 0,23

(mediana:0,06); e Smad 8 de 0 a 0,10 (mediana:0,01). A análise pareada dos valores relativos a expressão das Smads (n=18) revelou um aumento significativo na expressão das Smad 3 e Smad 6 (p=0,02 cada) e da Smad 7 (p=0,001), a Smad 1 (p=0,09) apresentou uma tendência ao aumento em relação à mucosa normal. As médias e desvios podem ser observados na tabela 5. Nos tumores pT1/T2 (n=4, p=0,02), pT3/T4 (n=14, p=0,01) e pN0 (n=10, p=0,006) somente a Smad 7 apresentou aumento significativo de expressão. No grupo tumores de pacientes com invasão linfonodal (n=8) as Smads 3 (p=0,02), Smad 6 (p=0,03) e Smad 7 (p=0,05) estavam mais expressas em relação à mucosa adjacente.

		Laringe (n=18)	
		Média ± DP	Sig
Smad 1	tumor	0,07 ± 0,06	0,09
	normal	0,05 ± 0,04	
Smad 2	tumor	0,18 ± 0,10	0,14
	normal	0,14 ± 0,10	
Smad 3	tumor	0,20 ± 0,13	0,02
	normal	0,15 ± 0,11	
Smad 4	tumor	0,14 ± 0,09	0,33
	normal	0,12 ± 0,08	
Smad 5	tumor	0,12 ± 0,08	0,17
	normal	0,10 ± 0,07	
Smad 6	tumor	0,03 ± 0,03	0,02
	normal	0,01 ± 0,01	
Smad 7	tumor	0,08 ± 0,08	0,00
	normal	0,03 ± 0,03	
Smad 8	tumor	0,03 ± 0,03	0,31
	normal	0,02 ± 0,03	

Tabela 5- Média e desvio padrão relativo a expressão de cada Smad nos tumores de laringe e na mucosa adjacente. Sig - resultado da comparação da expressão de cada Smad entre os dois grupos. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

A comparação da expressão dos mRNAs das Smads entre os tumores pN0 e pN+ (figura 7) revelou que todas as Smads, exceto a Smad 7, estavam significativamente mais expressas no grupo pN+ (Smad 1 p=0,04, Smad 2 p= 0,08, Smad 3 p=0,05, Smad 4 p=0,03, Smad 5 p=0,02, Smad 6 p=0,001 e Smad 8 p=0,02). Em relação ao tamanho do tumor, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos.

Figura 7: Expressão dos mRNAs das Smads em HNSCC da laringe e mucosa adjacente. Representação gráfica da média e desvio padrão relativa a expressão de cada Smad no grupo de pacientes com (pN+) e sem (pN0) comprometimento de linfonodos. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

Análise de Sobrevida Global e Livre de Doença

A etapa seguinte deste trabalho foi avaliar se a expressão desses marcadores apresentava alguma associação com a sobrevida global e sobrevida livre de doença desses pacientes. Para isso, os pacientes foram divididos em Smad positivo/negativo segundo a mediana de expressão das respectivas Smads nos tumores: positivo quando a expressão foi superior e negativo, expressão inferior ou igual à mediana.

O seguimento dos pacientes como um todo variou de 0,23 a 43,27 meses. Considerando os pacientes com HNSCC da cavidade oral, a sobrevida mediana dos pacientes Smad negativo e positivo, respectivamente, foi de 28,43 e 30,87 meses para Smad1; de 28,43 e 15,37 meses para Smad 2; de 22,97 e 31,13 meses para Smad 3; de 28,43 e 30,87 para Smad 4; de 14,60 e 30,87 meses para Smad 5; de 14,60 meses e a mediana não foi alcançada para o grupo Smad 6 positivo; de 14,60 e 31,13 meses para Smad 7; e de 28,43 e 30,87 meses para Smad 8. As curvas de Kaplan-Meier estão representadas na figura 8. Pela análise do Log Rank, observamos que os pacientes Smad 6 positivos apresentaram vantagem de sobrevida sobre o grupo Smad 6 negativo ($p=0,004$). Os grupos Smad 5 positivo

(Log Rank = 0,098) e Smad 7 positivo (Log Rank= 0,08) apresentaram uma vantagem de sobrevida marginalmente significativa sobre o grupo negativo.

Figura 8 – Curvas de sobrevida global de pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral. Nesta figura vemos as Curvas de Kaplan-Meier dos pacientes agrupados em positivo (superior)/negativo (inferior ou igual) segundo a mediana de expressão de cada Smad nos tumores. A análise de sobrevida foi realizada segundo o teste do Log Rank e os valores estão representados ao lado de cada curva. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. As medianas de sobrevida de cada grupo bem com o número de pacientes estão detalhados na tabela 6.

A sobrevida global dos pacientes com HNSCC da cavidade oral também foi avaliada estratificando os pacientes segundo comprometimento linfonodal. Os valores medianos, em meses, para cada um dos grupos positivo/negativo pN0/pN+ estão representados na tabela 6, e as curvas de Kaplan-Meier podem ser vistas na figura 9. Pela análise de Log Rank, verificamos que no grupo de pacientes sem comprometimento da cadeia ganglionar, pN0, houve vantagem de sobrevida nos pacientes Smad 5 positivos (Log Rank= 0,04), Smad 6 positivos (Log Rank = 0,009) e Smad 7 positivo (Log Rank= 0,048). Considerando esses três marcadores, Smad 5, Smad 6 e Smad 7 e ainda estatus linfonodal na análise multivariada, verificamos que a Smad 6 apresentou-se como um fator prognóstico independente ($p=0,031$; intervalo de confiança 0,07 – 0,88).

Figura 9 - Curvas de sobrevivência global de pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral.

Nesta figura vemos as Curvas de Kaplan-Meier dos pacientes agrupados em positivo — (superior)/ negativo — (inferior ou igual) segundo a mediana de expressão de cada Smad nos tumores estratificados de acordo com o estatus nodal. A análise de sobrevivência foi realizada segundo o teste do Log Rank e os valores estão representados ao lado de cada curva. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. As medianas de sobrevivência de cada grupo bem com o número de pacientes estão detalhados na tabela 6.

Para analisar se a expressão das Smads apresentava alguma associação com recidiva, avaliamos a sobrevida livre de doença dos pacientes pelo mesmo método. Os pacientes Smad 6 positivos apresentaram maior intervalo livre de doença em relação aos Smad 6 negativos (Log Rank= 0,005). Estratificando os pacientes quanto à invasão de linfonodos, o maior intervalo livre de doença foi observado nos pacientes pN0 Smad 6 positivos (Log Rank = 0,01).

A análise das curvas de Kaplan-Meier dos pacientes portadores de HNSCC de laringe mostrou não haver associação entre a expressão das Smads e sobrevida global dos pacientes. Entretanto, foi possível observar um padrão inverso daquele observado nos tumores da cavidade oral, ou seja, pacientes com tumores Smad negativos em geral, apresentaram vantagem de sobrevida sobre os Smad positivos. Em relação à sobrevida livre de doença, verificamos que os tumores Smad 3 negativos apresentaram maior intervalo livre de doença do que os Smad 3 positivos (Log Rank = 0,04). Uma tendência a esse maior intervalo livre de doença pode ser observado em relação aos pacientes Smad 2 negativos (Log Rank = 0,07) e Smad 4 negativos (Log Rank = 0,08). Na análise multivariada nenhuma associação positiva foi encontrada tanto em relação à sobrevida global quanto à livre de doença.

Cavidade Oral

		Nº pacientes	Nº eventos	mediana (meses)	Log Rank
Smad 1	Neg	27	10	28,43	0,46
	Pos	25	09	30,87	
pN0					
Smad 1	Neg	13	06	28,43	0,17
	Pos	12	02	-	
pN+					
Smad 1	Neg	14	04	13,67	0,83
	Pos	13	07	12,93	
Smad 3	Neg	27	09	22,97	0,28
	Pos	25	10	31,13	
pN0					
Smad 3	Neg	13	04	22,97	0,41
	Pos	12	04	31,13	
pN+					
Smad 3	Neg	14	05	13,67	0,49
	Pos	13	06	30,87	
Smad 5	Neg	26	10	14,60	0,098
	Pos	26	09	30,87	
pN0					
Smad 5	Neg	12	05	22,97	0,04
	Pos	13	03	31,13	
pN+					
Smad 5	Neg	14	05	13,67	0,82
	Pos	13	06	12,93	
Smad 7	Neg	26	11	14,60	0,08
	Pos	26	08	31,13	
pN0					
Smad 7	Neg	15	06	22,97	0,049
	Pos	10	02	-	
pN+					
Smad 7	Neg	11	05	12,93	0,59
	Pos	16	06	30,87	

		Nº pacientes	Nº eventos	mediana (meses)	Log Rank
Smad 2	Neg	26	06	28,43	0,45
	Pos	26	13	15,37	
pN0					
Smad 2	Neg	15	04	28,43	0,75
	Pos	10	04	31,13	
pN+					
Smad 2	Neg	11	02	-	0,21
	Pos	16	09	11,27	
Smad 4	Neg	26	07	28,43	0,68
	Pos	26	12	30,87	
pN0					
Smad 4	Neg	15	05	28,43	0,37
	Pos	10	03	31,13	
pN+					
Smad 4	Neg	11	02	-	0,21
	Pos	16	09	11,27	
Smad 6	Neg	29	15	14,60	0,004
	Pos	23	04	-	
pN0					
Smad 6	Neg	11	07	22,97	0,01
	Pos	14	01		
pN+					
Smad 6	Neg	18	08	12,93	0,20
	Pos	9	03	30,87	
Smad 8	Neg	26	10	28,43	0,27
	Pos	26	09	30,87	
pN0					
Smad 8	Neg	11	05	28,43	0,11
	Pos	14	03	-	
pN+					
Smad 8	Neg	15	05	-	0,74
	Pos	12	06	12,93	

Tabela 6 – Análise de sobrevida dos pacientes portadores de HNSCC da cavidade oral, estratificado em Smad positivos (pos, superior à mediana) e negativos (neg, inferior ou igual à mediana) segundo a mediana de expressão de cada Smad nos tumores, no grupo como um todo e nos subgrupos prognósticos de comprometimento de linfonodos: pN+ (linfonodo comprometido) e pN0 (linfonodo livre).

AP-1

A expressão dos mRNAs de c-jun, junD, junB, c-fos, fosB, fra-1 e fra-2 foi avaliada em fragmentos de tumor obtidos de 45 pacientes com HNSCC e de mucosa adjacente (tabela 2). Os sinais representativos de Northern em tumor e mucosa normal adjacente estão apresentados na figura 10A. Os transcritos de c-jun, junD, fosB e c-fos apresentaram uma banda única de 2,7 kb, 1,9 kb, 3,8 kb e 2,2 kb, respectivamente. Dois transcritos de fra-1 (3,3 kb e 1,7 kb) e três de fra-2 (7 kb, 4,4 kb e 2,4 kb) foram detectados. Uma vez que o método de Northern blotting não foi sensível o suficiente para quantificar os baixos níveis do mRNA de junB, esta isoforma foi analisada por RT-PCR semiquantitativa. A análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose mostrou a presença desse transcrito tanto no tecido tumoral como na mucosa adjacente (Figura 10B). Os resultados da RT-PCR semi-quantitativa sugerem que a expressão de JunB foi mais intensa no tecido morfológicamente normal quando comparado ao tumor, sem diferença estatisticamente significativa.

A quantificação dos sinais de Northern, após normalização com rRNA 18S, indicou que os níveis dos mRNAs de c-fos, fosB e junD variou muito nos tecidos tumorais apresentando um padrão bipolar. Os níveis dos mRNAs de fosB e c-fos variaram respectivamente de 0 a 2,68 (média = $0,74 \pm 0,71$) e de 0,01 a 3,05 (média = $0,77 \pm 0,78$). Uma expressão fraca ou moderada desses transcritos foi encontrada em aproximadamente 60% dos tumores enquanto uma forte expressão, considerada como valores densitométricos acima de um (> 1) foi observada em 40% dos casos. Em relação ao JunD, 75% das amostras de tumor apresentaram expressão intensa ou muito intensa do mRNA e apenas 25% apresentou expressão moderada, com uma variação de expressão de 0,55 a 5,0 (média = $1,76 \pm 1,22$). Os valores de fra-1 variaram de 0,35 a 2,75 (média = $1,28 \pm 0,7$) enquanto os valores do mRNA de fra-2

variaram de 0,66 a 6,51 (média = $2,7 \pm 2,0$) com 58% e 84% dos tumores apresentando uma expressão muito forte de fra-1 e fra-2, respectivamente.

Figura 10 – A. Foto representativa de hibridização de Northern Blot. O RNA total foi extraído, submetido a eletroforese em gel de agarose e transferido para membrana de Nylon. Os filtros foram hibridizados com aproximadamente 2×10^6 cpm/mL da sonda de cDNA marcada com $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP. A expressão dos mRNAs corresponde à razão entre os valores densitométricos dos elementos de AP-1 e do respectivo rRNA 18S. **B- Ensaio representativo de RT-PCR semi-quantitativa.** O RNA total das amostras de tecido tumoral e mucosa adjacente foi reversamente transcrito e amplificado por PCR em 35 ciclos para Jun B e 25 ciclos para β actina. T – tumor, N – mucosa adjacente normal

A variação e a média de expressão dos mRNAs da família AP-1 no tecido tumoral e na mucosa adjacente está representado na figura 11. A comparação dos valores densitométricos entre tecido tumoral e mucosa normal adjacente revelou não

haver diferenças na expressão de c-fos, junD ou fosB, enquanto que o mRNA de fra-1 estava consistentemente mais expresso nos tumores ($p = 0,006$). A distribuição dos valores de fra-2 entre os tecidos tumorais e mucosa adjacente resultou em uma diferença marginalmente significativa ($p = 0,07$ t-teste).

Figure 11. Análise de Boxplot representando a expressão dos mRNAs de junD, c-fos, fosB, fra-1 e fra-2 expressos em relação ao rRNA 18S em HNSCC e mucosa normal adjacente. Caixas, 25%, 50% e 75%; barras, 10% e 90%; °, valores acima dentro do limite de 1.5 a-3 vezes o limite do quartil superior; * valores acima de 3x do quartil superior; Dois pacientes que ultrapassaram os limites dde 3 x o quartil superior da caixa para fra-1 foram excluídos para melhor visualização.

O próximo passo foi associar a expressão dos elementos de AP-1 com sítio primário do tumor, idade e grau histológico. Nenhuma associação significativa com qualquer um desses parâmetros foi encontrada. Em relação ao estadiamento TNM, nós não encontramos alteração significativa na expressão de c-fos, junB, junD ou fra-2 em tumores de pacientes com (pN+) ou sem (pN0) envolvimento de linfonodos. Quando os tumores foram classificados em Fra-1 negativo ou positivo (igual/abaixo ou acima da mediana de expressão do mRNA de Fra-1), observamos uma relação

direta entre a expressão positiva de Fra-1 e a presença de linfonodos comprometidos (Teste de Fisher $p=0,006$, figura 12) Em relação ao tamanho do tumor, somente o mRNA de junD foi significativamente menor nos tumores pT1+pT2 versus tumores pT3+pT4 ($0,84 \pm 0,44$ vs $2,07 \pm 1,22$, $p = 0,003$).

Figura 12. Distribuição dos pacientes de acordo com a expressão do mRNA de Fra-1 e o estatus nodal. Cada ponto representa um paciente e as linhas, a mediana de expressão de cada grupo. A mediana foi comparada entre os grupos e revelou uma maior expressão de fra-1 no grupo pN+ do que no grupo pN0.

Uma vez que o mRNA de fra-1 estava aumentado nos HNSCC estudados, a proteína correspondente foi estudada por imunohistoquímica em um pequeno grupo de pacientes para confirmar os dados da hibridização. Devido à intensa reatividade, um *tissue array* foi realizado em uma coleção de 180 tumores e 29 amostras normais (tabela 3). Quase todas as amostras tumorais (95%) foram fortemente reativas para Fra-1 enquanto na mucosa adjacente a positividade foi restrita a camada basal. Os resultados resumidos na tabela 7 indicaram que a distribuição subcelular de Fra-1 difere entre tumores quando comparado a mucosa adjacente. Poucos casos foram completamente negativos, quase metade dos casos (79/180) apresentaram dupla marcação núcleo/citoplasma, uma marcação exclusivamente citoplasmática foi

observada em 61/180 e de membrana em 36/180. Marcação exclusivamente nuclear não foi observada em nenhuma amostra tumoral (figura 13).

Na análise de subgrupo, os tumores da cavidade oral apresentaram uma mudança evidente da imunoreatividade de Fra-1 de uma marcação simultânea núcleo/citoplasma para uma exclusivamente citoplasmática quando os tumores pN0 foram comparados aos pN+ (Teste de Fisher, $p = 0,0005$). Uma tendência a esse comportamento foi observada nos tumores de faringe ($p=0.15$), mas não nos tumores de laringe. Nenhuma das cinco mucosas normais derivadas de pacientes sem neoplasia apresentaram positividade para Fra-1. O acúmulo progressivo de Fra-1 e a mudança na localização subcelular está ilustrado na figura 13.

Sítio Primário	linfonodo	Marcação de Fra-1 n (%)					total
		Negativo	Exclusivamente Nuclear	Exclusivamente Citoplasma	Núcleo/citoplasma	Exclusivamente membrana	
Cavidade Oral	pN0	1	0	5	29	4	39
	pN+	1	0	21	17	9	48
Faringe	pN0	1	0	8	8	3	20
	pN+	1	0	13	4	5	23
Laringe	pN0	0	0	7	11	7	25
	pN+	0	0	7	10	8	25
Mucosa Adjacente		6	4	3	16	0	29

Tabela 7 – Resumos dos resultados imunohistoquímicos com anticorpo anti- Fra-1, no ensaio de *tissue array*, em HNSCC (n=180) classificados por sítio primário e estatus nodal (comprometido, pN+ ou não, pN0) e em mucosa adjacente ao tumor morfolologicamente normal (n=29). Número em negrito: teste de Fisher $p=0,0005$.

Figure 13. Fotos representativas do ensaio de *tissue array* com anti-corpo anti-Fra-1. A- Parte da lâmina de *tissue array* contendo 180 HNSCC e 29 amostras de mucosa adjacente após reação de imunohistoquímica contra Fra-1 (22,5x). **B-** Tecido normal adjacente marcado nas células da camada basal (400x). **C-** Carcinoma de Célula Escamosa bem diferenciado da Cavidade Oral Mucosa, pN0, mostrando marcação concomitante de núcleo e citoplasma (400x). **D-** Carcinoma de Célula Escamosa moderadamente diferenciado da Cavidade Oral Mucosa, pN0, com marcação nuclear e uma marcação citoplasmática mais intensa (400x). **E-** Carcinoma de Célula Escamosa moderadamente diferenciado da Cavidade Oral Mucosa, pN+, com

DISCUSSÃO

No presente trabalho, traçamos um perfil da expressão dos mRNAs da família das Smads em Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Levando em conta que Smads fazem parte da via de sinalização de TGF β , o aumento geral de expressão de Smads que detectamos no tumor comparado com a mucosa adjacente seria esperado, tendo em conta a superexpressão de TGF β descrita em vários tumores. A favor disso, nós mesmos já havíamos descrito aumento na expressão do mRNA de TGF β tanto em tumores da cavidade oral (n=32) como da laringe (n=21) quando comparados à mucosa adjacente (Pasini e cols., 2001).

Considerando que TGF β tem ação antiproliferativa em tecido epitelial normal, uma hipótese sempre aventada é de que nos cânceres, haveria uma resistência a essa ação e de que seu efeito seria proliferativo. Exemplos descritos na literatura reforçam a idéia de que essa resistência exista. Em microdissecções de fragmentos de tumor de laringe, Nerlich e cols. (2003) encontraram 35 mutações em 5 de um total de 12 pacientes analisados, enquanto nenhuma mutação foi achada no estroma peritumoral ou epitélio normal desses pacientes. Das mutações encontradas, 23 estavam associadas com a perda dos efeitos de TGF β , tais como mudanças de base resultando em troca de aminoácido ou deleções, gerando códons de finalização (*stop codon*) no receptor tipo II (T β RII).

Em câncer de esôfago, outro tipo de carcinoma epidermóide, a quantificação protéica dos receptores de TGF β por imunohistoquímica revelou uma redução de expressão dos T β RI e do T β RII em 53,8% e 28,8% do total de 80 amostras de tumor estudadas. Essa redução mostrou-se associada ao aumento da expressão de TGF β , invasão, comprometimento linfonodal e estágio patológico avançado (Fukai e cols., 2003). Dois outros grupos, em trabalhos independentes, descreveram em duas séries pequenas de 13 SCC da cavidade oral e em 38 HNSSC, que existe

diminuição progressiva da imunoreatividade para T β RII de tecidos normais para tumoral, nessa ordem: mucosa adjacente com tecido displásico e/ou carcinoma *in situ*, tumor primário, linfonodo metastático (Paterson e cols., 2001, Muro-Cacho e cols., 1999). As conseqüências dessa redução não foram avaliadas por nenhum dos desses autores.

Alterações da via de sinalização a jusante dos receptores também são potenciais causadores da perda de resposta a TGF β . Uma dessas vias, é a da família Smads, cujos membros parecem ser os principais mediadores intracelular da sinalização da família do TGF β . Um acúmulo de evidências sugere que alterações afetando esses marcadores contribuam para a carcinogênese epitelial. Faltam, entretanto, dados concretos para indicar que isso possa ser verdade, pois, embora alguns tenham se empenhado em caracterizar a expressão das Smads em certos tipos de tumor, nenhum estudo, ao que sabemos, apresentou uma descrição sistemática de todos os elementos dessa família, como apresentamos neste estudo.

Em uma proposta semelhante à nossa, Xie e cols. (2003) determinaram, por *tissue array*, a imunoreatividade das Smads 2, 3 e 4 em 170 HNSCC. Esses autores encontraram Smad 2 presente em noventa e nove por cento das amostras, o que está de acordo com os 95,5% de positividade para o mRNA que descrevemos neste trabalho. Ainda, 86% apresentavam a proteína fosforilada, ou seja, ativada, sugerindo que a sinalização de TGF β seja funcional na maioria dos HNSCC. Esses autores observaram uma alta expressão nuclear de Smad 3 em 100% das amostras, coincidindo com os nossos 96,7%. A expressão de Smad4 foi observada em 78% sendo as demais amostras negativas, um pouco menor do que os 95,5% das nossas, mas é difícil considerar até que ponto esses valores são distintos, uma vez que um se trata de mRNA e outro de proteína. Entretanto, não há na literatura

trabalhos que demonstrem algum tipo de alteração em Smad que impeça a tradução do mRNA, assim, poderíamos considerar que existe uma relação entre a expressão de mRNA e da proteína nos tecidos.

Em outro estudo, a expressão das Smads 2, 3, 4, 6 e 7 foi avaliada por imunohistoquímica em apenas 13 HNSCC, mostrando perda da expressão de Smad 2 em 5 de 13 amostras (38%), a Smad 3 estava expressa em todas as amostras, e as demais expressas seguindo um padrão variável (Muro-Cacho e cols., 2001). Esses dados divergem dos nossos dados, que mostram que todas as Smads, com exceção da Smad 6 (70%) e Smad 8 (53,3%), estão presentes em mais de 95% das amostras estudadas. Ainda Muro-Cacho e cols. (2001) observaram igual expressão das proteínas Smads 4, 6 e 7 no tumor, na mucosa adjacente ao tumor e na mucosa de pacientes sem câncer, embora uma análise estatística clara não tenha sido feita, o que torna difícil a comparação com os nossos dados, ou seja, de que existe aumento na expressão do mRNA das Smads no tumor em relação à mucosa adjacente.

Um dado de relevância obtido no nosso estudo refere-se à associação entre a expressão positiva do mRNA de Smad 6 e uma maior sobrevida global e um maior intervalo livre de doença. Não encontramos na literatura nenhum trabalho que associasse a expressão de Smad 6 com sobrevida, sendo este o primeiro trabalho a apresentar a expressão do mRNA de Smad 6 como um fator prognóstico independente pela análise multivariada.

São poucos os trabalhos que correlacionam a expressão das Smads com sobrevida global em pacientes portadores de câncer e os que existem ainda não são conclusivos. Em dois trabalhos, o mesmo grupo tentou associar a expressão de Smad 4 com prognóstico, abordando a expressão dessa proteína por

imunohistoquímica em uma série de 249 tumores gástricos avançados e em 258 tumores de esôfago (Xiangming e cols., 2001; Natsugoe e cols., 2002). Os resultados obtidos demonstraram que a redução de Smad 4 estava associada a um pior prognóstico: a taxa de sobrevida de 5 anos no grupo com expressão reduzida comparada com o de expressão preservada foi de 39,4% versus 50,4% ($p=0,03$) no grupo com tumores gástricos, e de 23,1% versus 37,7% ($p=0,01$) no grupo com tumor de esôfago.

Ainda em tumores gástricos, Kim e cols. (2004) descrevem que de um total de 304 pacientes, 266 apresentaram positividade para Smad 4 por *tissue array* associada a um melhor prognóstico, com uma taxa de sobrevida de 5 anos de 64,4% contra 49,8% dos pacientes com tumor Smad 4 negativo ($p=0,017$). Resultados esses semelhantes aos dados já descritos por Xiangming e cols. (2001). Kim e cols. (2004) descrevem também a existência de uma relação inversa entre a expressão de Smad 7 e Smad 4, sendo que pacientes com tumores Smad 7 negativos apresentaram maior taxa de sobrevida (67,5%) do que os Smad 7 positivos (52,2%, $p=0,011$). A somatória desses dois fatores, ou seja, pacientes com tumores Smad 4+/Smad 7-, apresentaram uma taxa de sobrevida significativamente maior (70,3%) do que o grupo Smad 4-/Smad 7+ (38,9%), sugerindo que estes possam ser indicadores prognósticos em carcinoma gástrico. Em nosso estudo, nenhuma associação entre a positividade das Smads 4 e 7 e prognóstico pode ser observada.

Em contraste com esses dados de Smad 4 apresentados por Kim e cols. (2004), outros autores concluíram não haver relação entre ausência das Smads 2 e 4 e prognóstico dos pacientes, conclusão essa baseada em estudo de carcinoma de cólon retal, analisando correlação entre deleção dos genes das Smads 2 e 4 e sobrevida global numa série de 264 pacientes. Já em relação a Smad 7, resultados

semelhantes aos anteriormente descritos foram obtidos, ou seja, a deleção desse gene estava associada com melhor sobrevida global ($p=0,001$) e livre de doença ($p=0,003$). Os autores mostram ainda que pacientes com ausência de ambos os alelos de Smad 7 têm um melhor prognóstico do que os com pelo menos uma cópia do gene, embora com uma significância limiar (Boulay e cols, 2003). Em HNSCC, tanto nosso grupo em 52 pacientes com tumor primário da cavidade oral e 26 de laringe, quanto o grupo de Xie e cols. (2003) em 170 HNSCC, não encontramos relação entre Smad 2, 4 e 7 e sobrevida global ou livre de doença.

A Smad 6, assim como a Smad 7, é uma Smad inibitória mas age em via distinta: a Smad 6 inibe preferencialmente a sinalização via BMP e a Smad 7 as vias da activina e TGF β . Foi descrito ainda que a Smad 6 age por mecanismo diferente da Smad 7: quando expressa em níveis suficientes para a inibição da sinalização de BMP, Smad 6 não interfere com a função do receptor, mas compete com a Smad 4 pela ligação à R-Smad 1 ativada gerando complexos Smad 1/Smad 6 inativos (Hata e cols., 1998; Ishisaki e cols., 1999). Em níveis de expressão mais elevados, a Smad 6 pode mimetizar a ação da Smad 7 e inibir a ação do TGF β impedindo a fosforilação da Smad 2 e a sua conseqüente associação com a Smad 4 (Imamura e cols., 1997). Além disso, foi demonstrado que o TGF β é capaz de induzir tanto a expressão do mRNA da Smad 7 quanto o de Smad 6 (Nakao e cols., 1997; Ishisaki e cols., 1999) por uma via dependente de Smad 4 (Afrakhte e cols., 1998). Outras vias de sinalização como a do EGF-R/EGF e possivelmente outros receptores tirosina-quinase já foram descritas como tendo efeito sobre a expressão dessas Smads (revisto por Derynck & Zhang, 2003). Esses achados poderiam explicar porque nossos pacientes com expressão de Smad 6 positiva apresentaram sobrevida global e livre de doença maior do que aqueles com Smad 6 negativo, ou seja, mesmo

tendo expressão elevada de TGF β (Pasini e cols., 2001), a indução de Smad 6 por TGF β ou por outra via estaria inibindo a ação tumorigênica dessa citocina. Além disso, segundo nossos dados em Pasini e cols. (2001), tumores pN0 expressam mais TGF β do que os pN+ e, de acordo com isso, no presente trabalho pudemos observar que pacientes pN0/Smad 6+ tem uma vantagem de sobrevida quando comparados com os pN0/Smad6-, sugerindo que esse aumento na expressão de TGF β possa estar exercendo uma função fisiológica que garanta uma vantagem de sobrevida para esses pacientes.

Os mecanismos moleculares que poderiam ser responsáveis pelo nosso achado de aumento de Smad 6 nos tumores não são claros. Sabe-se, entretanto, que pelo menos duas vias importantes agem sobre a expressão das Smads: a própria via do TGF β e a via das MAPK. As MAPK podem ser ativadas por fatores de crescimento que ativem Ras, como é o caso do fator de crescimento epidermal (EGF). Já foi descrita uma relação cruzada entre essas duas vias, mas essa relação ainda é controversa: há trabalhos que apontam para uma relação de cooperação e outros demonstram efeitos antagônicos entre elas. O mecanismo proposto por Kretzschmar e cols. (1999) é o de que, pelo menos em cultura de células epiteliais mamárias EpH4, a ativação de EGF/Ras reprime a ação de TGF β por promover a fosforilação das Smads 2 e 3 em sítios distintos daqueles fosforilados por TGF β , impedindo a translocação dessas proteínas para o núcleo e a conseqüente ativação transcricional. Em contraste, por ensaios de luciferase, também foi demonstrado que a fosforilação de Smad 2 por EGF potencializa a ação de TGF β . Além disso, foi demonstrado que Smad 4 participa da sinalização tanto dos receptores de TGF β , serino-treonina kinase, como dos receptores de EGF e HGF (*hepatocyte growth factor*), tirosina-kinase (Caestecker e cols., 1998).

Assim, pensando nas duas possibilidades, de que $\text{TGF}\beta$ continue agindo como um agente antiproliferativo no tumor ou de que $\text{TGF}\beta$ coopere com a carcinogênese, tendo um efeito perverso proliferativo, poderiam ser duas as explicações fisiopatológicas para o aumento da Smad 6: a primeira seria a de que o aumento de Smad6 refletiria a funcionalidade da via de $\text{TGF}\beta$ e, portanto, nos pacientes Smad 6 positivos, $\text{TGF}\beta$ estaria exercendo seu papel antiproliferativo conferindo melhor prognóstico (figura Da). Outra explicação poderia ser a de que Smad 6 seja induzida por outras vias, como a do EGF/Ras, bloqueando a ação tumorigênica de $\text{TGF}\beta$ (figura Db). É lógico que para qualquer uma dessas explicações, teríamos de supor que a expressão do mensageiro corresponde à da proteína, que não o foi o objetivo desta tese mensurar.

Figura D – Esquema representando as duas hipóteses para o aumento de Smad 6 observado nos tumores de HNSCC.

Outro objetivo do nosso trabalho foi estudar o RNA mensageiro da família AP1, uma via com interface importante com TGF β /Smads. A via de TGF β parece ser responsável pela indução de expressão dos mRNAs de junB e c-jun, seja diretamente ou de formas transitória, através de sitio SBE presente na região promotora desses genes (Wong e cols, 1999 e Groot & Kruijer, 1990). Além dessa indução direta de elementos da família jun-fos, TGF β também parece ser capaz de induzir, por mecanismo ainda desconhecido, a formação de complexos AP-1 específicos, como JunD/FosB em culturas de células mieloide murina, M1, e de hepatoma humano, Gep3B, como demonstrado por ensaios de *supershift*, estando associada à indução de apoptose (Yamamura e cols., 2000). De acordo com isso, neste estudo encontramos uma correlação positiva entre a expressão de Smad3 e junD ($p=0,007$) e fosB ($p=0,028$, dados não apresentados), embora a expressão de junD e fosB não estivesse aumentada em relação a mucosa adjacente. Assim, esse poderia ser mais um indicativo da atividade de TGF β nesse tipo de tumor. Embora o mecanismo envolvido na indução desses complexos AP1 por TGF β ainda não sejam conhecidos, a existência de conexão entre a via de sinalização de MAPK e TGF β poderia explicar essa correlação, ou seja, a Smad ativada poderia induzir transcricionalmente AP1, em cruzamento com a via de MAPK.

Neste trabalho, a análise da expressão dos elementos da família AP-1 demonstrou não haver diferença entre a expressão dos mRNAs de c-Fos, FosB, JunB e JunD do tecido tumoral e da mucosa normal adjacente. Já a expressão do mRNA de Fra-1 estava mais elevada no tecido tumoral e acompanhada por aumento da expressão da proteína, concordando com dados previamente publicados em linhagem HNSCC (Ondrey e cols., 1999; Serewko e cols., 2002). Essa superexpressão poderia ser decorrente do aumento na estabilidade da proteína

como observado em linhagem celular de tireóide e de carcinoma de cólon (Casalino e cols., 2003 e Vial & Marshall, 2003). A superexpressão de Fra-1 também já foi descrita em outros tipos de tumores sólidos como câncer de tireóide (Chiappetta e cols., 2000), carcinoma escamoso de esôfago (Hu e cols., 2001) e câncer de endométrio e próstata (Bamberger e cols., 2001; Zerbini e cols., 2003).

Há várias evidências sugerindo que Fra-1 exerça um papel essencial durante a carcinogênese de célula epitelial, mas a função exata e suas implicações moleculares permanecem desconhecidas. Uma possibilidade seria a de que esse aumento de expressão resulte na transcrição de genes associados com a transição epitélio-mesênquima (Bergers e cols., 1995; Kustikova e cols., 1998).

Dados anteriores de nosso grupo mostraram um aumento na expressão de c-jun em HNSCC quando comparado com a mucosa adjacente (Pacheco e cols., 2002) e tem sido sugerido que este possa ser o par de Fra-1 na regulação da expressão de genes como uPA, uPAR e PAI-1 (Anderson e cols., 2002). Os nossos dados anteriormente publicados de correlação entre os mRNAs de uPA, PAI e TGF β em HNSCC (Pasini e cols., 2001) já sugeriam uma interligação entre essas vias, reforçada também pela descrição de relação direta entre aumento de c-jun e uPA (Pacheco e cols., 2002) em 38 amostras tumorais de pacientes com HNSCC. Essa relação entre AP-1 e uPA também já havia sido descrita por outros autores em linhagem celular derivada de carcinoma de ovário humano tratada com TGF β (Wakahara e cols., 2004). De acordo com esses últimos, haveria uma via de regulação da expressão de PAI e uPA por TGF β , envolvendo as Smads e MAPK/AP-1, respectivamente.

Nossos resultados mostram ainda que tumores pN+ expressam mais mRNA de Fra-1 do que os pN0. Esse dado estaria de acordo com a observação de

Zajchowski e cols. (2001) que encontraram uma forte associação entre a expressão de Fra-1 e capacidade de invasão em linhagens celulares mamárias. Outro achado nosso se refere à localização preferencialmente citoplasmática/nuclear da proteína de Fra-1 nos tumores pN0 da cavidade oral quando comparados aos tumores pN+, dado esse em concordância com o padrão de imunoreatividade descrito em neoplasias de tireóide (Chiappetta e cols., 2000). Entretanto, diverge daqueles descritos em linhagens derivadas de neoplasias de cabeça e pescoço e de esôfago onde a marcação parece ser predominantemente nuclear (Serewko e cols., 2002; Hu e cols., 2001). Exceto pelo fato de termos estudado tumores de pacientes e não linhagem celulares, a razão para essa diferença não é clara.

Além disso, nossos resultados mostram um acúmulo citoplasmático da proteína em 44% dos tumores pN+ da cavidade oral, provavelmente aprisionado e inativo, como foi descrito para outros elementos da família AP-1 com localização citoplasmática em queratinócitos (Briata e cols., 1993). Mas se assim fosse, Fra-1 não poderia ser responsável por aumento do mRNA de uPA, o que poderia estar de acordo com dados de nosso grupo já publicados pelos quais, pelo menos na cavidade oral, a expressão de uPA estaria menor em tumores pN+ do que nos pN0 (Pasini e cols., 2001).

Outro achado nosso foi a imunoreatividade de membrana presente em alguns tumores, embora ausente em todas as mucosa adjacente estudadas, o que sugere que parte do Fra-1 sintetizado possa ser secretada nos tumores. Determinações adicionais serão necessárias para esclarecer essa sublocalização inesperada. Deve ser ressaltado que a imunoreatividade da mucosa adjacente ao tumor foi fraca para Fra-1, sendo negativa na mucosa de pacientes sem neoplasia, sugerindo que

alteração de expressão de Fra-1 deve ocorrer precocemente antes do surgimento do tecido histologicamente maligno em HNSCC.

Nossos dados, em conjunto, mostram que dentre os vários membros da família AP-1, Fra-1 com aumento tanto do seu mRNA como da proteína, parece ser um marcador promissor em HNSCC, devendo ser melhor esclarecido a sua relação com a presença de linfonodos comprometidos. Em relação às Smads, a expressão do seu transcrito mostrou-se mais elevada nos tumores quando comparados a mucosa e além disso, as curvas de sobrevida de Kaplan Meier e a análise multivariada mostraram que a positividade de Smad 6 parece ser um fator determinante de bom prognóstico em HNSCC, independente do status nodal. Nossos dados corroboram a importância dessa via em HNSCC e indicam que os mecanismos moleculares responsáveis por esses eventos merecem ser melhor enfocados em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afrakhte M, Moren A, Jossan S, Itoh S, Sampath K, Westermarck B, Heldin Ch, Heldin Ne, Ten Dijke P. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 249(2):505-11.
- Andersen H, Mahmood S, Tkach V, Cohn M, Kustikova O, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E, Tulchinsky E. The ability of Fos family members to produce phenotypic changes in epithelioid cells is not directly linked to their transactivation potentials. *Oncogene*. 2002; 21(31):4843-8.
- Angel P & Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 72(2-3):129-5.
- Arnhein N. Characterization of mouse ribosomal gene fragments purified by molecular cloning. *Gene*. 1979; 7, 83-96.
- Bamberger AM, Milde-Langosch K, Rossing E, Goemann C. & Loning T. Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001; 127, 545-550.
- Bergers G, Graninger P, Braselmann S, Wrighton C. & Busslinger M. Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol Cell Biol*. 1995; 15, 3748-3758
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-23.
- Boulay JL, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, Laffer U, Herrmann R, Rochlitz C. SMAD7 is a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2003;104(4):446-9.
- Briata P, D'Anna F, Franzi AT & Gherzi R. AP-1 Activity during normal human keratinocyte differentiation: evidence for a cytosolic of AP-1/DNA binding. *Exp. Cell. Res*. 1993; 204, 136-146.
- Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ. Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev*. 1998;12(11):1587-92.
- Casalino L, De Cesare D, Verde P. Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(12):4401-15.
-

- Chiappetta G, Tallini G, De Biasio M.C, Pentimalli F, de Nigris F, Losito S, Fedele M, Battista S, Verde P, Santoro M. & Fusco A. FRA-1 expression in hyperplastic and neoplastic thyroid diseases. *Clin Cancer Res.* 2000; 6, 4300-4306.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425(6958):577-84.
- Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(5):265-73.
- Ensley Jf, Maciorowski Z. Clinical applications of DNA content parameters in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Semin Oncols.* 1994; 21(3):330-9.
- Federico Mhh, Snitcovsky Im & Koike Ma. Flow cytometry in Head and Neck tumors. *Acta Oncol Bras.* 1995;15: 21-4.
- Franchi A, Gallo O, Sardi I, Santucci M. Downregulation of transforming growth factor beta type II receptor in laryngeal carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2001; 54(3):201-4.
- Fukai Y, Fukuchi M, Masuda N, Osawa H, Kato H, Nakajima T, Kuwano H. Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2003;104(2):161-6.
- Groot Rp, Kruijer W. Transcriptional activation by TGF beta 1 mediated by the dyad symmetry element (DSE) and the TPA responsive element (TRE). *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168(3):1074-81.
- Hagedorn H, Sauer U, Schleicher E, Nerlich A. Expression of TGF-beta 1 protein and mRNA and the effect on the tissue remodeling in laryngeal carcinomas. *Anticancer Res.* 1999; 19(5B):4265-72.
- Hata A, Shi Y, Massague J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today.* 1998; 4(6):257-62.
- Heldin Ch, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997; 390(6659):465-71.
- Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J. & Srivastava G. Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA
-

- expression array: over expression of Fra-1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7, 2213-2221.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature.* 1997; 9;389(6651):622-6.
- INCA-Instituto Nacional De Câncer. Coordenação De Programas De Controle De Câncer - Pro-Onco, Site: www.inca.org.br
- Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K, Ten Dijke P, Sugino H, Nishihara T. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem.* 1999; 7;274(19):13637-42.
- Jochum W, Passegue E, Wagner Ef. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001; 20(19):2401-12.
- Johnson Nw, Ranasinghe Aw, Warnakulasuriya. Potentially malignant lesions and conditions of the mouth and oropharynx: natural history--cellular and molecular markers of risk. *Eur J Cancer Prev.* 1993; 2:31-5
- Jonk Lj, Itoh S, Heldin Ch, Ten Dijke P, Kruijer W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem.* 1998; 273(33):21145-52.
- Kalkhoven E, Roelen Ba, De Winter Jp, Mummery Cl, Van Den Eijnden-Van Raaij Aj, Van Der Saag Pt, Van Der Burg B. Resistance to transforming growth factor beta and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. *Cell Growth Differ.* 1995; 6(9):1151-61.
- Kearsley Jh, Bryson G, Battistutta D, Collins Rj. Prognostic importance of cellular DNA content in head-and-neck squamous-cell cancers. A comparison of retrospective and prospective series. *Int J Cancer.* 1991; 47(1):31-7.
- Kim Yh, Lee Hs, Lee Hj, Hur K, Kim Wh, Bang Yj, Kim Sj, Lee Ku, Choe Kj, Yang Hk. Prognostic significance of the expression of Smad4 and Smad7 in human gastric carcinomas. *Ann Oncol.* 2004; 15,574-80.
-

- Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 1999;13(7):804-16.
- Kustikova O, Kramerov D, Grigorian M, Berezin V, Bock E,. Lukanidin E. & Tulchinsky E. Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 1998; 18, 7095-7105.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan Rs, Zborowska E, Kinzler Kw, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995; 268(5215):1336-8.
- Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; 19(8):1745-54.
- Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene.* 2001; 20(19):2378-89.
- Miyazono K, Ten Dijke P, Heldin Ch. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol.* 2000; 75:115-57.
- Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer.* 1995; 75:147-53.
- Muro-Cacho Ca, Anderson M, Cordero J, Munoz-Antonia T. Expression of transforming growth factor beta type II receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(6):1243-8.
- Muro-Cacho Ca, Rosario-Ortiz K, Livingston S, Munoz-Antonia T. Defective transforming growth factor beta signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by the lack of expression of activated Smad2. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(6):1618-26.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JI, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin Ne, Heldin Ch, Ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 1997; 389(6651):631-5.
- Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, Okumura H, Nakashima S, Sakita H, Ishigami S, Baba M, Takao S, Aikou T. Smad4 and transforming growth factor
-

- beta1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(6):1838-42.
- Nerlich Ag, Sauer U, Ruoss I, Hagedorn Hg. High frequency of TGF-beta-receptor-II mutations in microdissected tissue samples from laryngeal squamous cell carcinomas. *Lab Invest.* 2003; 83(8):1241-51.
- Norgard P, Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Skovgaard Poulsen H. Growth suppression by transforming growth factor beta 1 of human small-cell lung cancer cell lines is associated with expression of the type II receptor. *Br J Cancer.* 1994, 69(5):802-8.
- Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog.* 1999; 26(2):119-29.
- Pacheco MM, Kowalski LP. Nishimoto IN & Brentani MM. Differential Expression c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinoma of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. *Head & Neck.* 2002; 24, 24-31.
- Park K, Kim Sj, Bang Yj, Park Jg, Kim Nk, Roberts Ab, Sporn Mb. Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(19):8772-6.
- Pasini Fs, Brentani Mm, Kowalski Lp, Federico Mh. Transforming growth factor beta1, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in head and neck squamous carcinoma and normal adjacent mucosa. *Head Neck.* 2001; 23(9):725-32.
- Paterson Ic, Matthews Jb, Huntley S, Robinson Cm, Fahey M, Parkinson Ek, Prime Ss. Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2001; 193(4):458-67
- Pisani P, Parkin Dm, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999; 83(1):18-29.
-

Projeto de Implantação do Registro Hospitalar RHC do HCFMUSP FAPESP /Projeto 99/07516-3 *Boletim nº01 HCFMUSP*.

Sakr W, Hussan M, Zarbo Rj, Ensley J, Crissman Jd. DNA quantitation and histologic characteristics of squamous cell carcinoma of the aerodigestive tract. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 113(9):1009-14.

Serewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W, Dicker AJ & Saunders NA. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*. 2002; 62, 3759-3765.

Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. 2001; 20(19):2390-400.

Souhami R & Tobias J. Cancer and its management. *Blakwell Science*. 1998; 3ed 148-73.

Sun L, Wu G, Willson Jk, Zborowska E, Yang J, Rajkarunanayake I, Wang J, Gentry Le, Wang Xf, Brattain Mg. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem*. 1994; 269(42):26449-55.

Vial E, Marshall CJ. Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 24):4957-63.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(2):615-9.

Wakahara K, Kobayashi H, Yagyu T, Matsuzaki H, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Transforming growth factor-beta1-dependent activation of Smad2/3 and up-regulation of PAI-1 expression is negatively regulated by Src in SKOV-3 human ovarian cancer cells. *J Cell Biochem*. 2004;93(3):437-53.

Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(1):22-9.

Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry Le, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson Jk, et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity

- in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1995; 270(37):22044-9.
- Wong C, Rougier-Chapman Em, Frederick Jp, Datto Mb, Liberati Nt, Li Jm, Wang Xf. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(3):1821-30.
- Wrana JI, Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11(1-2): 5-13.
- Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Ishigami S, Tanabe G, Baba M, Kuroshima K, Aikou T. Preserved Smad4 expression in the transforming growth factor beta signaling pathway is a favorable prognostic factor in patients with advanced gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7, 277-82.
- Xie W, Bharathy S, Kim D, Haffty Bg, Rimm DI, Reiss M. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncol Res.* 2003;14(2):61-73.
- Xu J, Gimenez-Conti Ib, Cunningham Je, Collet Am, Luna Ma, Lanfranchi He, Spitz Mr, Conti Cj. Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer.* 1998; 83(2):204-12.
- Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, Lodish HF. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 2000; 275(46):36295-302.
- Yan W, Vellucci Vf, Reiss M. Smad protein expression and activation in transforming growth factor-beta refractory human squamous cell carcinoma cells. *Oncol Res.* 2000; 12(3):157-67.
- Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP & Johnson PH. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61.
- Zerbini LF, Wang Y, Cho JJ & Libermann, TA. Constitutive Activation of Nuclear Factor kB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003; 63, 2206-2215.
-

ANEXO

Trabalho enviado para publicação na Revista
International Journal of Experimental Pathology

Fos-related antigen (Fra-1) overexpression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

Mangone, FRR – MSc¹, Brentani, MM – PhD^{1,2}, Nonogaki, S³, Begnami, MDFS – MD⁴, Campos, AHJFM – MD⁴, Walder, F – MD, PhD⁵, Carvalho, MB – MD, PhD⁵, Soares, FA – MD, PhD⁴, Torloni, H – MD⁴, Kowalski, LP – MD, PhD⁴, Federico, MHH – MD, PhD^{1,2}

¹Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – Departamento de Radiologia - Disciplina de Oncologia, ²Laboratório de Investigação Médica – LIM 24 – Hospital das Clínicas FMUSP, ³Instituto Adolfo Lutz, ⁴Hospital do Câncer, ⁵Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Hospital Heliópolis – São Paulo, SP, Brasil

address for correspondence:

Maria Mitzi Brentani
Faculdade de Medicina da USP
Departamento de Radiologia
Disciplina de Oncologia
Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar, sala 4112
01246-903, São Paulo, SP, Brasil
Fone/FAX: 55 11 3082.6580
e-mail: mbrentani@lim24.fm.usp.br

Short running title: Fra-1 in HNSCC.

ABSTRACT

The activating protein-1 (Ap-1) family of transcription factors has been implicated in the control of proliferation and differentiation of keratinocytes but its role in malignant transformation is not clear. The aim of this study was to assess the pattern of mRNA expression of jun-fos AP-1 family members in 45 samples of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) and matched adjacent mucosa by Northern analysis. Transcripts of all family members were identified, except for JunB that was detected only by RT-PCR. Neither c-Fos nor JunD or FosB mRNA differed between tumors and normal tissues. We observed a strong Fra-1 and Fra-2 expression, but only Fra-1 mRNA densitometric values were higher in tumor as compared to normal adjacent mucosa (t-test, $p=0.006$). A direct relationship between the positive expression of Fra-1 mRNA, above tumor median, was associated with the presence of compromised lymph nodes (Fischer exact test, $p=0.006$). In addition, Fra-1 protein staining was assessed in a collection of 180 tumors and 29 histologically normal samples adjacent to tumors in a tissue array. Weak reactivity, restricted to the basal cell layer, was detected in 79% of tumor adjacent normal tissues as opposed to the intense reactivity of cancer tissues. In the subgroup of oral cancers, we have seen a shift in Fra-1 immunoreactivity, as long as the number of patients in each category, cytoplasmic or nuclear/cytoplasmic staining, was analysed (Fischer exact test, $p=0.0005$). Thus, Fra-1 gene induction and accumulation of Fra-1 protein may contribute to the neoplastic phenotype in HNSCC.

Keywords: Fra-1, AP-1, HNSCC, northern blot, tissue array.

INTRODUCTION

Squamous cell carcinomas (HNSCC) are the most frequent head and neck neoplasms, the sixth most frequent cancer worldwide and the fifth in our country (Vokes et al, 1993; INCA 2002).

Several molecular alterations have been described that are thought to play a role in HNSCC development and progression, involving genes important to cell proliferation and invasion. As a result, many oncogene products, growth factors and receptors linked to proliferative pathways are frequently overexpressed in HNSCC (Schraml et al, 1999; Leethanakul et al, 2000; Takes et al, 2001; Serewko et al, 2002; Freier et al, 2003). The ultimate effect of this sustained activation of growth factors and receptors may be the stimulation of nuclear transcription factors such as the “activating protein-1” (AP-1).

The AP-1 transcription factor is a dimeric complex comprised of members of the JUN, FOS, ATF (activating transcription factor) and MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma) protein families. The fos family consists of four gene products (c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2) while the jun family is made up of 3 gene products (c-Jun, JunB and JunD). As a consequence, the AP-1 complex can be formed by a multitude of heterodimers and homodimers, depending on the stimulus and duration. During carcinogenesis, different dimer combinations may be required at different stages of tumorigenesis (reviewed in Eferl and Wagner, 2003). The ultimate effect of this imbalance may be the reprogramming of gene expression, which may switch the selection of target genes to those expressed during the invasive process (Crawford et al, 1996; Ozanne et al, 2000). In fact, overexpression of proteolytic enzymes such as urokinase-type plasminogen activator (uPA) and metalloproteinases was already described in HNSCC (Johansson and Kahari, 2000; Pasini et al, 2001; O-Charoenrat et al, 2001; Alevizos et al, 2001; Pacheco et al, 2002; Nagata et al, 2003).

In squamous carcinoma, previous published works had found a relationship between AP-1 activity, cell transformation and malignant progression (Yuspa, 1998). Concerning head and neck tumors, few studies had examined AP-1 expression (Ondrey et al, 1999; Serewko et al, 2002; Pacheco et al, 2002) and none focused all members of jun-fos family. Our own previously published data indicated that c-Jun mRNA was differentially expressed in HNSCC, as compared to adjacent normal tissue, and correlated with the expression of uPA mRNA, implicating in a possible role of these factors in invasion (Pacheco et al, 2002).

The purpose of the present study was to investigate the expression pattern of the remaining jun-fos family members in a group of HNSCC tumor fragments, collected prospectively. Northern blot analysis of tumors was performed for each one of the AP-1 members, and the changes in gene expression pattern were analyzed in the context of clinical pathological parameters. Since Fra-1 was the only member found consistently overexpressed in tumors as compared to normal mucosa, we assessed the correspondent protein immunohistochemically, in a collection of HNSCC paraffin blocks, using tissue array technique.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Tumor Samples – In this study, we analyzed by Northern blot a total of 45 operable HNSCC patients admitted at Head and Neck Surgery Service of Hospital Heliópolis, São Paulo, Brazil. None of the patients had received any previous treatment. Tumor staging was determined according to the Fifth Edition of the UICC TNM Classification of Malignant Tumors. The histological grade, lymph node status and tumor site and width were obtained from the surgical pathological report. The general characteristics of the patients are described in table 1. After surgery, the surgical specimens of tumor and adjacent mucosa were immediately frozen and stored in liquid nitrogen. All patients were advised of the procedures and gave informed consent to participate in the study.

cDNA synthesis and cloning – The complementary DNA (cDNA) sequences of each human AP-1 mRNA member (c-Jun, JunB JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2) were generated by RT-PCR using specific primers designed by “Primer3 Output” software (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) and total RNA obtained from the MDA-MB-231 cell line. The forward and reverse primers sequences used were, respectively: c-Jun: 5' AGG AGG AGC CTC AGA CAG TG 3' and 5' TGT TTA AGC TGT GCC ACC TG 3'; JunB: 5' ACT CTT TAG AGA CTA AGT GCG 3' and 5' GAA ACA GAC TCG ATT CAT A 3'; JunD: 5' GAG TGT TCG ATT CTG CCC TA 3' and 5' TGT GGA CTC GTA GCA AAC AA 3'; c-Fos: 5' ATC TGT GCG TGA AAC ACA 3' and 5' TCC AGC ACC AGG TTA ATT CC 3'; FosB: 5' ACC CTT TTC TGA TCG TCT CG 3' and 5' CTG CTC ACA CTC ACA CTC G 3'; Fra-1: 5'GCC TGT GCT TGA ACC TGA G 3' and 5' GCT GCT ACT CTT GCG ATG A 3'; Fra-2: 5' CCC AGT GTG CAA GAT TAG CC 3' and 5' CCC AGT GTG CAA GAT TAG CC 3'; β actin: 5' CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC 3' and 5'

CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T 3'. PCR was performed with 200 ng of cDNA and 0.25 μ M of each primer. The PCR profile was: 5 minutes at 95°C; 35 cycles: 1 minute at 95°C, 1 minute at 54°C and 1 minute at 72°C; final extension at 72°C for 10 minutes. The purified PCR products were then subcloned into the PCR[®] 4-TOPO.TA Cloning[®] *kit* (Invitrogen, Rockville, MD, USA) and sequenced. The 18S rRNA cDNA in pBR322 (1.9Kb Sal I/Eco RI fragment) was provided by Dr. Arnhein, New York, NY (Arnhein, 1979).

Probes– Probes were radiolabeled using a red-prime DNA labeling system (Amersham Corp., Amersham, UK) with [α -³²P]dCTP (Amersham Corp., Amersham, UK) and approximately 2x10⁶cpm/ml of radiolabeled probes were used for hybridization.

RNA isolation and Northern Blot analysis - Frozen tumor fragments were pulverized and total RNA was isolated using TRIZOL reagents (Invitrogen, Rockville, MD, USA). Total RNA (15 μ g each) was electrophoresed on 1% agarose gel and transferred to a Hybond-N membrane (Amersham Corp., Amersham, UK). After overnight hybridization at 42°C in hybridization solution (5x SSPE, 50% formamide, 5x dextran, 5% Denhardt's, 1% SDS and 100 μ g/ml of Salmon Sperm DNA), filters were washed twice with 2x SSPE + 0.1% SDS solution at room temperature and twice with 1x SSPE + 0.1% SDS, one at 52°C and the other at room temperature, and then exposed to a Kodak XAR-5 X-ray film at -70°C with an intensifier screen. Band intensities were quantified by densitometric scanning and data were expressed as the ratio of the specific mRNA to 18S rRNA. A total of 37 patients were analyzed for the presence of c-Jun mRNA expression, 32 for JunD and FosB, 37 for c-Fos and 29 for Fra-1 and Fra-2.

Semi-quantitative RT-PCR – JunB mRNA expression was analyzed in total RNA samples obtained from tumor and adjacent normal tissue of 15 HNSCC patients. Five micrograms of total RNA was treated with 1 U of DNase-RNase free (Promega, Madison, WI, USA), 10 mM MgCl₂, and 1 mM DTT in a final volume of 100 µl of TE, pH 7.4, for 10 minutes at 37°C. The reaction was stopped by adding 25 µl of stop mix (100 mM EDTA, 3 M sodium acetate and 2% SDS) and followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. For the reverse transcriptase reaction (RT), total RNA was incubated with 5 mM random hexamer (Amersham Corp., Amersham, UK) at 70°C for 10 minutes, and then, with 1x Super Script II buffer (Promega, Madison, WI, USA), for 60 minutes at 42°C 20 µM dNTP, 5 mM DTT and 25 U Super Script II in a 20 µl final volume. PCR was performed as described above. Number of cycles was optimized for both JunB and β-actin primers to ensure that amplification was in the linear range and the results were semiquantitative. The established amplification cycles were 35 and 25 cycles for JunB and β-actin, respectively. PCR products were visualized by electrophoresis on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and quantified by densitometry (Image Master – IMVDS software, Amersham)

Tissue Array – A total of 180 cases of HNSCC were retrieved from the archives of the AC Camargo – Cancer Hospital. All tissues had been fixed in formalin, embedded in paraffin and HE-stained slides from each specimen were submitted to pathological review to reconfirm diagnosis and selection of the blocks. Samples included 87 oral cavity cases (39 pN0, 48 pN+), 50 larynx tumors (25 pN0, 25 pN+) and 43 pharynx carcinomas (20 pN0, pN+ 23). Twenty-nine samples of normal mucosa were also included. For the construction of the HNSCC tissue array, new sections were obtained from the representative paraffin blocks, and all the H&E-stained slides for these cases were

reviewed. A slide with representative condition was selected from each case and an area was circled on the slide. The corresponding formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were retrieved, and the area corresponding to the selected area on the slide was circled on the block. Using a tissue microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) the area of interest in the donor paraffin block was cored twice with a 0.6 mm diameter needle and transferred to a recipient paraffin block. Sections of 4 μ m were cut from HNSCC tissue array blocks, deparaffined, rehydrated and submitted to immunohistochemistry with Fra-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, California, USA; dilution 1:100). Staining for Fra-1 was visualized using a standard 3,3' diamino benzydine procedure. Fra-1 expression by more than 10% of cells was considered positive. Specificity of the immunoreaction was verified upon omission of the primary antibody. Epithelia of 5 patients who underwent operation for other reasons than malignancy were collected for comparison, including 3 tongue samples (hemangioma), 1 rhinopharynx (lymphoid hyperplasia) and 1 larynx (cyst).

Statistical Analysis – The associations of categorical variables between tumor and adjacent mucosa were investigated by the paired t-test, Fisher's exact test and the BoxPlot analyses, performed using SPSS 10.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Tumor fragments and adjacent normal mucosa of 45 patients with HNSCC were examined for the expression of c-jun, JunD, JunB, c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 mRNAs. Representative Northern signals from tumors and their respective non-malignant areas are displayed in Figure 1A; c-jun, JunD and c-Fos transcripts were respectively identified as single autoradiographic bands of 2.7 kb, 1.9 kb and 2.2 kb. Two Fra-1 transcripts (3.3 kb and 1.7 kb) and three Fra-2 (7 kb, 4.4 kb and 2.4 kb) were detected. Since the Northern blotting method was not sensitive enough to quantify low levels of JunB mRNA, this isoform was analyzed by RT-PCR. The analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis showed the presence of JunB mRNA in normal and tumor tissues. The semiquantitative RT-PCR suggested that the expression of JunB were more intense in the morphologically normal adjacent tissue as compared to tumors, but differences were not statistically significant (Figure 1B).

Quantification of Northern signals, after normalization with rRNA 18S, indicated that c-Fos, FosB and JunD mRNA levels varied strongly among tumor specimens. FosB and c-Fos mRNA levels ranged from 0 to 2.68 (mean = 0.74 ± 0.71) and from 0.01 to 3.05 (mean = 0.77 ± 0.78), respectively. Weak to moderate expression of these mRNAs was found in approximately 60% of the tumors whereas strong expression, considered as a densitometric value above one (>1) was observed in 40%. Concerning JunD, 75% of tumor samples presented strong or very strong expression and only 25% exhibited moderate expression. JunD mRNA densitometric values ranged from 0.55 to 5.0, with a mean value of 1.76 ± 1.22 . Fra-1 values ranged from 0.35 to 2.75, with a mean value of 1.28 ± 0.7 whereas Fra-2 mRNA values ranged from 0.66 to 6.51 (mean = 2.7 ± 2.0), with 58% and 84% of the tumors presenting very strong expression of Fra-1 and Fra-2, respectively.

The degree of variation of AP-1 family genes in normal and neoplastic tissue is illustrated in Figure 2. No differences in c-Fos, JunD or FosB expression were found between tumors and normal adjacent mucosa whereas Fra-1 mRNA was consistently overexpressed in tumors compared to normal controls ($p = 0.006$). Concerning the distribution of Fra-2 densitometric values among non-neoplastic and neoplastic tissues, they were marginally different, as revealed by paired t-test ($p=0.07$).

Our next step was to associate the expression of each AP-1 family member with site, age and histological grade and no significant associations were found between AP1 and those parameters. Concerning TNM stage, we did not find any differences between the expression of c-Fos, JunB, JunD or Fra-2 in tumors with compromised lymph nodes (pN+) as compared to tumors without (pN0) lymph-node involvement. When tumors were classified as Fra-1 negative or positive (equal/ below or above the median tumor mRNA expression, respectively), there was an inverse correlation between Fra-1 expression and lymph node invasion (Fisher's test $p=0.006$, Figure 3). In relation to tumor size, only JunD mRNA was significantly lower in T1/T2 as compared to T3/T4 tumors (0.84 ± 0.44 vs 2.07 ± 1.22 , $p = 0.003$).

Since we had found Fra-1 mRNA overexpressed in head and neck tumors, the corresponding protein was studied, initially in a small subgroup of ten patients, by immunohistochemistry. Due to intense immunoreactivity, a tissue array was done in a collection of 180 tumors, 29 tumor adjacent normal samples and 5 normal mucosa from non-cancer patients (figure4). Almost all tumor samples (95%) were strongly immunoreactive for Fra-1 recognizing antibody whereas tumor adjacent normal tissue displayed a weak immunoreactivity restricted to basal cell layer. The results summarized in table 2 indicated that the subcellular distribution of Fra-1 also differed among tumors as compared to normal tissues. Very few cases were completely negative, almost half the cases (79/180 cases) displayed nuclear/cytoplasm double staining, only cytoplasmic

staining (61/180) or only membranous staining 36/180). Exclusively nuclear reactivity was never found in tumors.

A sub-group analysis of oral cavity tumors revealed a clear shift in Fra-1 immunoreactivity, from a simultaneous nuclear and cytosolic to an exclusively cytoplasmic localization (table 2), as long as the number of patients with each staining pattern was compared between pN0 and pN+ groups ($p=0.0005$ Fisher's Exact test). A tendency towards this behavior was also observed in pharynx tumors ($p=0.15$), but was not seen in larynx tumors. The progressive accumulation of Fra-1 protein and the changes occurring in its subcellular localization are illustrated in figure 4. None of the five normal mucosa, derived from patients without malignancy, presented a positive reactivity with Fra-1 antibody. Representative examples of Fra-1 protein immunostaining in normal adjacent tissue, well-differentiated pN0 tissue, moderately-differentiated pN0 samples and moderately-differentiated pN+ tissue were displayed, showing a progressive accumulation of the protein and also the change in its subcellular localization.

DISCUSSION

We reported here a systematic analysis of mRNA expression of the members of the AP-1 family in HNSCC. Even if c-Fos, FosB, JunB and JunD mRNA densitometric values, displayed by neoplastic tissues, did not differ from correspondent values expressed by normal, matched tumor adjacent mucosa, Fra-1 mRNA were overexpressed in tumors. This is in agreement with our results showing an increased immunoreactivity of Fra-1 protein determined by tissue array. In parallel, an increased stability of the Fra-1 protein may occur (Casalino et al, 2003, Vial and Marshall, 2003). In addition, we had already described that another member of this family, c-jun, was overexpressed in HNSCC. (Pacheco et al, 2002).

Our observations showing that, not only Fra-1 mRNA but also Fra-1 protein is increased in HNSCC, are in accordance with previous studies in head and neck squamous cell carcinoma lines (Ondrey et al, 1999; Serewko et al, 2002). The overexpression of Fra-1 protein had also been described in a variety of epithelial neoplasias including thyroid cancer (Chiappetta et al, 2000), esophageal squamous carcinoma (Hu et al, 2001), endometrial and prostate cancer (Bamberger et al, 2001; Zerbini et al, 2003). Data reported by Zajchowiski et al (2001) demonstrated a tight association of Fra-1 expression with highly invasive breast cancer cell lines.

There are several evidences that indicate Fra-1 plays an essential role during the epithelial cell oncogenesis. However, the exact molecular implications and the role played by this marker in malignancy remains unclear. One possibility is that its overexpression results in the transcription of progression-associated genes and induction of epithelial mesenchymal transition (Bergers et al, 1995; Kustikova et al, 1998). In addition, Fra-1 is thought, in partnership with c-jun, to drive the expression of genes such uPA, uPAr and

PAI-1 (Andersen et al, 2002). Our own preceding published data on AP-1 had suggested an association between the concomitant increase of c-jun and uPA mRNA (Pacheco et al., 2002).

The preferential cytoplasmic/nuclear concomitant localization, seen in pN0 oral cancers as compared to pN+ tumors, is in accordance with recently reported Fra-1 staining pattern described in neoplastic thyroid diseases (Chiappetta et al, 2000). These data is in disagreement with others describing Fra-1 as predominantly nuclear in head and neck (Serewko et al, 2002) and in esophageal cancer cells (Hu et al, 2001). Apart from the fact that we have studied patient tumors and not cell lineages, the reason for these differences is not clear. Our present data indicated that Fra-1 is accumulated in the cytoplasm of 44% pN+ oral cavity tumors, possibly trapped and inactive, as described for the cytosolic form of AP1 family members in keratinocytes (Briata et al, 1993). Therefore, Fra-1 probably could not be responsible for the increase in uPA mRNA. This is also in agreement with our previous data showing that, at least in oral cancer, uPA mRNA was decreased in pN+ tumors as compared to pN0 tumors (Pasini et al., 2001). However, this conflicts with the conception that pN+ tumors express high levels of proteinases (Nagata et al, 2003). Alternatively, the activation of specific signaling pathways in lymph node positive tumors may result in an imbalance among AP-1 complexes, favoring other AP-1 dimers implicated with oral cancer progression.

Apart from the positive immunostaining of Fra-1 in some tumor membranes, surrounding tissues never displayed a similar localization, suggesting that a fraction of newly made Fra-1 can be secreted. Additional determinations are required to clarify the reason for this unexpected localization.

In our study, it must be stressed that the histologically normal appearing mucosa, adjacent to the tumor tissue, were also positive for Fra-1, which never occurred in tissues

of patients without neoplasia. These findings may reflect early changes occurring before the appearance of histologically recognizable malignant tissue in HNSCC.

In conclusion, we have found Fra-1 specific transcripts increased in almost all tumors. These accumulation of Fra-1 mRNA and protein, seems to be a widespread event in head and neck carcinomas. However, the molecular mechanism involved need to be studied in detail.

ACKNOWLEDGEMENTS

Technical assistance of C. Nascimento and C.T. Braconi was gratefully acknowledged. This study was supported by Fapesp 02/01738-9 and CNPq.

REFERENCES

- Alevizos I., Mahadevappa M., Zhang X., Ohya H., Kohno Y., Posner M., Gallagher G.T., Varvares M., Cohen D., Kim D., Kent R., Donoff R.B., Todd R., Yung C.M., Warrington J.A. & Wong D.T. (2001) Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* **20**, 6196-6204.
- Arnheim N. (1979) Characterization of mouse ribosomal gene fragments purified by molecular cloning. *Gene* **7**, 83-96.
- Bamberger A.M., Milde-Langosch K., Rossing E., Goemann C. & Loning T. (2001) Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. *J Cancer Res Clin Oncol.* **127**, 545-550.
- Bergers G., Graninger P., Braselmann S., Wrighton C. & Busslinger M. (1995) Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol Cell Biol.* **15**, 3748-3758
- Briata P., D'Anna F., Franzi A.T. & Gherzi R. (1993) AP-1 Activity during normal human keratinocyte differentiation: evidence for a cytosolic of AP-1/DNA binding. *Exp. Cell. Res.* **204**, 136-146.
- Chiappetta G., Tallini G., De Biasio M.C., Pentimalli F., de Nigris F., Losito S., Fedele M., Battista S., Verde P., Santoro M. & Fusco A. (2000) FRA-1 expression in hyperplastic and neoplastic thyroid diseases. *Clin Cancer Res.* **6**, 4300-4306.
- Crawford H.C. & Matrisian L.M. Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. (1996) *Enzyme Protein* **49**, 20-37.
-

Eferl, R. & Wagner E.F. (2003) AP-1: A Double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Rev. Cancer* **3**, 859-868.

Freier K., Joos S., Flechtenmacher C., Devens F., Benner A., Bosch .FX., Lichter P. & Hofele C. (2003) Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 1179-1182.

Hu Y.C., Lam K.Y. Law S., Wong J. & Srivastava G. (2001) Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: over expression of Fra-1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2213-2221.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Brazilian Health Ministry, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer do Brasil, Ministério da Saúde, Brasil, 2002.

Johansson N. & Kahari V.M. (2000) Matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma. *Histol. Histopathol.* **15**, 225-237.

Kustikova O., Kramerov D., Grigorian M., Berezin V., Bock E., Lukanidin E. & Tulchinsky E. (1998) Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7095-7105.

Leethanakul C., Patel V., Gillespie J., Pallente M., Ensley J.F., Koontongkaew S., Liotta L.A., Emmert-Buck M. & Gutkind J.S. (2000) Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* **19**, 3220-3224.

- Nagata M., Fujita H., Ida H., Hoshina H., Inoue T., Seki Y., Ohnishi M., Ohyama T., Shingaki S., Kaji M., Saku T. & Takagi R. (2003) Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int. J. Cancer* **106**, 683-689.
- O-Charoenrat P., Rhys-Evans P.H. & Eccles S.A. (2001) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **127**, 813-820.
- Ondrey, F.G., Dong G., Sunwoo J., Chen Z., Wolf J.S., Crowl-Brancroft C., Mukaida N. & Van Waes C. (1999) Constitutive activation of transcription factors NF-(k)B, an NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol. Carcinog.* **26**, 119-129.
- Ozanne B.W., McGarry L., Spence H.J., Johnston I., Winnie J., Meagher L. & Stapleton G. (2000) Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur. J. Cancer* **36**, 1640-1648.
- Pacheco M.M., Kowalski L.P.; Nishimoto I.N. & Brentani M.M. (2002) Differential Expression c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinoma of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. *Head & Neck* **24**, 24-31.
- Pasini F.S., Brentani M.M., Kowalski L.P. & Federico M.H. (2001) Transforming growth factor beta1, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in head and neck squamous carcinoma and normal adjacent mucosa. *Head Neck* **23**, 725-732.
-

- Schraml P., Kononen J., Bubendorf L., Moch H., Bissig H., Nocito A., Mihatsch M.J., Kallioniemi O.P. & Sauter G. (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1966-1975.
- Serewko M.M., Popa C., Dahler A.L., Smith L., Strutton G.M., Coman W., Dicker A.J. & Saunders NA. (2002) Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res.* **62**, 3759-3765.
- Takes R.P., Baatenburg de Jong R.J., Wijffels K., Schuurin E., Litvinov S.V., Hermans J. & van Krieken J.H. (2001) Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J. Pathol.* **194**, 298-302.
- Vokes E.E., Weichsebaum R.R., Lippman S.M. & Ki long W. (1993) Head and Neck cancer. *New England J. Med.* **328**, 184-194.
- Yuspa S.H. (1998) The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 1-7.
- Zajchowski D.A., Bartholdi M.F., Gong Y., Webster L., Liu H.L., Munishkin A., Beauheim C., Harvey S., Ethier S.P. & Johnson P.H. (2001) Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**,
- Zerbini, L.F., Wang Y., Cho J.J. & Libermann, T.A. (2003) Constitutive Activation of Nuclear Factor kB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res.* **63**, 2206-2215.
-

Figure 1 – AP-1 mRNA expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma **A-** Representative Northern Blot assay. Total RNA was extracted, electrophoresed on agarose gel and transferred to a nylon membrane, as described in Methods. These filters were hybridized with complementary cDNA probes labeled with [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (2×10^6 cpm/ml) and to rRNA 18S (5×10^5 cpm/ml). The AP-1 mRNA expression were estimated as the densitometric value relative to corresponding rRNA 18S signal. **B-** Representative JunB semiquantitative RT-PCR assay. N- adjacent normal mucosa T-tumor samples.

Figure 2. Boxplot analysis representing the mRNA expression of JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 mRNA normalized to 18S rRNA in HNSCC and matched adjacent mucosa. *Boxes*, 25th, 50th and 75th percentiles; *bars*, 10th and 90th percentiles; °, outlier values (1.5-3 box-lengths from the 75th percentiles); *, extreme values (>3 box-lengths from the 75th percentiles). Two patients with extreme values for Fra-1 expression, both for tumor and mucosa, were excluded from the graph for better visualization.

Figure 3. Dispersion of patients according to Fra-1 mRNA expression and lymph node status. Each point represents a patient and the spotted line, the median values of tumor Fra-1 expression, above which, tumors were considered Fra-1 positive (pos) and bellow, negative (neg). The analysis of the distribution of values of each group revealed a close relationship between Fra-1 expression and the presence of lymph node invasion (Fisher's test $p=0.006$). Three patients with extreme values were taken off the graphic for better visualization.

Figure 4. **A-** Part of the tissue array slide containing 180 HNSCC and 29 adjacent normal mucosa samples immunohistochemically stained against Fra-1 protein (22.5x). **B-** Surrounding normal tissue showing staining of cells in basal layer (400x). **C-** Well-differentiated oral cavity squamous cell carcinoma, stage pN0, displaying concomitant nuclear and cytoplasmic immunostaining (400x). **D-** Moderately-differentiated squamous cell carcinoma of the oral cavity, stage pN0, with nuclear and more intense cytoplasmic immunostaining (400x). **E-** Moderately-differentiated squamous cell carcinoma of the oral cavity, stage pN+, with exclusively cytoplasmic immunostaining (400x).

Table 1– Clinical-pathological characteristics of the 45 HNSCC patients whose tumor tissues were studied by Northern Blot.

Characteristic	n	%
Sex		
Male	41	91.1
Female	4	8.9
Age		
Median	55	-
Range	30-80	-
Tumor size		
pT1+T2	10	22.2
pT3+T4	35	77.8
Lymph node status		
pN0	23	51.1
pN+	22	48.9
Tumor site		
Oral cavity	20	44.5
Larynx	19	42.2
Oropharynx	06	13.3
Stage		
III	23	51.1
IV	22	48.9

Table 2 - Summary of immunohistochemical staining against Fra-1 results in HNSCC tumors (n=180) classified by site and lymph-node status (compromised, pN+ or not, pN0) and morphologically normal epithelium (n=29). Bold numbers: Fisher's exact test $p=0.0005$.

Primary tumor site	Lymph node	Fra-1 immunoreactivity (number of patients)					Total n
		Negative	Exclusively Nuclear	Exclusively Cytoplasmic	Nuclear/ cytoplasmic	Exclusively Membrane	
Oral cavity	pN0	1	0	5	29	4	39
	pN+	1	0	21	17	9	48
Pharynx	pN0	1	0	8	8	3	20
	pN+	1	0	13	4	5	23
Larynx	pN0	0	0	7	11	7	25
	pN+	0	0	7	10	8	25
Tumor Adjacent Mucosa		6	4	3	16	0	29