

TATIANA NAYARA LIBÓRIO DOS SANTOS

**TRANSCRITOS DO GENE PITX1 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
DE BOCA: AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR E LOCALIZAÇÃO POR
HIBRIDIZAÇÃO IN SITU**

São Paulo

2004

Tatiana Nayara Libório dos Santos

**Transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca:
amplificação por RT-PCR e localização por hibridização *in situ***

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2004

FOLHA DE APROVAÇÃO

Libório dos Santos, TN. Transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca: amplificação por RT-PCR e localização por hibridização *in situ* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

São Paulo, __/__/__.

Banca Examinadora

1) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Joaquim e Maria, que são as pessoas mais importantes da minha vida, as quais tenho profundo amor, respeito e admiração pelo amor, entrega e ensinamentos recebidos para trilhar os caminhos do bem e da moral.

Aos meus irmãos Juliana, Luciana e Rodrigo pela união e amor sempre compartilhados.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes** pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade para orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço também a amizade e respeito mútuo.

À **Profa Dra Vera Cavalcanti de Araújo** e ao **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo** pela oportunidade de participar do mundo científico e estar próxima dos dois exemplos maiores de competência e sabedoria a serem seguidos na pesquisa.

À todos os professores da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, **Profa Dra Suzana C. Orsini Machado de Sousa, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Profa Dra Marina Helena C. G. de Magalhães, Profa Dra Marília Trierveiler Martins e Profa Dra Andréa Mantesso** pelo convívio, disponibilidade e integração com os alunos de pós-graduação.

Ao **Prof Ms. Jecônias Câmara**, chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), responsável pela disciplina de Patologia Bucal desse departamento e por meu início na carreira docente, pela confiança depositada, pelo infinito estímulo para crescer e pelo suporte durante meu afastamento.

À todos os professores do DPML da UFAM principalmente **Profa Neila Falconi, Prof. Dr. Luís Carlos de Lima Ferreira, Prof. Dr. Dirceu Benedicto Ferreira e Profa Ms. Luciana Fujimoto Botinelli**, responsáveis pela disciplina de patologia médica, por todo apoio, incentivo para cursar pós-graduação e amizade sempre recebidas.

À Dra. **Maria das Graças da Silva-Valenzuela**, pessoa de grande importância na execução de várias etapas desse trabalho, pela amizade, pela sabedoria e por todos os ensinamentos adquiridos em relação à postura em um laboratório de pesquisa.

À **Luciana Matizonkas e Adriana Neves** pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso nas práticas laboratoriais e a todos os integrantes do laboratório de biologia molecular, em especial **Thaís Acquafreda, Nívea, Ricardo, Lineu, Fernanda e Cláudia**.

Aos amigos da Patologia Bucal que tive o prazer de conviver **Adriana Aetges, Fabrício Bitu, Elena Riet, Carlos Barbosa, Márcia Gorishi, Paulo Braz, Cristiane Fursi, Juliana Kimura, Karen Hiraki, Carol, Fabrício Passador, Arlindo Aburad, Felipe Torquato, Felipe Modolo, Katiuchia Uzzum, Alexandre Fraige, Natalie Pepe, Cláudia Ronca, Patrícia Cury, Sérgio, Alexander, Paulo e Marcelo** pela amizade e convivência harmoniosa.

À todas as funcionárias da disciplina de patologia bucal **Zilda, Néia, Nair, Patrícia, Edna, Elisa e Bia** pelo convívio e pela presteza sempre que foi preciso.

Ao apoio financeiro recebido da **Universidade Federal do Amazonas** e do **Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, indispensáveis para minha estadia em São Paulo para cursar Patologia Bucal.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento do projeto referente ao estudo de genes homeobox do nosso laboratório, do qual esse trabalho faz parte.

Ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da FMUSP, representado pelo **Prof Dr. Alberto Ferraz**, pela parceria e concessão das amostras de tecidos utilizados para o projeto realizado em nosso laboratório.

Ao amigo **Arlindo Eira Filho** pela ajuda na análise estatística dos casos utilizados nesse trabalho.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no mestrado da FOU SP .

Agradeço também aos amigos da casa de chá **Khan el Khalili**, pelos momentos mágicos e agradáveis.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis".*

Bertolt Brecht

Libório dos Santos, TN. Transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca: amplificação por RT-PCR e localização por hibridização *in situ* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

RESUMO

Os genes homeobox atuam na morfogênese e na diferenciação celular e vêm sendo relacionados a cânceres em humanos. O projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço” encontrou aproximadamente 20 desses genes possivelmente envolvidos com esse tipo de neoplasia e o PITX1 foi um dos genes encontrados. Sabe-se que o gene PITX1 está relacionado ao desenvolvimento das estruturas anteriores do embrião, porém sua participação em neoplasias não está bem estabelecida até o momento. Nesse estudo nos propusemos a verificar a presença de transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca e tecidos não tumorais adjacentes, analisando sua possível relação com a morfologia das células neoplásicas. Para tanto, os transcritos do gene foram amplificados por RT-PCR e sua localização celular determinada por hibridização *in situ* com sondas de mRNA específicas. Os resultados mostraram que o transcrito sofreu amplificação em 86,2% dos casos, sendo que 28% foram somente nos tumores, 16% somente nos tecidos não tumorais e 56% em ambos os tecidos. A análise estatística através do Z-test (teste de diferença de proporção entre duas populações) mostrou que não houve diferença significativa entre a amplificação e o tipo de tecido analisado. Reações de hibridização *in situ* mostraram marcação predominante no componente epitelial de maneira heterogênea ora intensa ora branda em populações

celulares diversas tanto nos tecidos tumorais quanto nos tecidos não tumorais adjacentes à lesão, sem relação aparente com a morfologia celular. De maneira geral, o sinal foi mais intenso no epitélio do tecido não tumoral quando comparado ao neoplásico. Frente aos resultados obtidos sugere-se que o gene PITX1 pode estar envolvido na carcinogênese de boca, sendo que a sua expressão está reduzida na maioria das células do carcinoma epidermóide de boca.

Palavras-Chave: Genes Homeobox; Carcinoma Epidermóide; Reação em Cadeia da Polimerase via transcriptase reversa RT-PCR; Hibridização In Situ.

Libório dos Santos, TN. PITX1 gene transcripts in oral squamous cell carcinoma: amplification by RT-PCR and localization by *in situ* hybridization [Dissertação de Mestrado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

ABSTRACT

Homeobox genes have functions on morphogenesis and cell differentiation and have been related with cancer in humans. PITX1 was one of the genes found in the Head and Neck Cancer Genome Project. It is known that PITX1 gene is related with anterior structures of the developing embryo, although its relation with neoplasm is not well established. In this study we proposed to verify the presence of PITX1 gene transcripts in oral squamous cell carcinoma and adjacent non-tumoral tissues, analyzing its possible relation with the morphology of neoplastic cells. For such study, gene transcripts were amplified by RT-PCR and its cellular localization determined by *in situ* hybridization with specific riboprobes. Results showed that the transcript was amplified in 86,2% of the cases; 28% were only in the tumors, 16% non-tumoral tissues and 56% were amplified in both tissues. Statistics analysis by Z-test showed there was no significant difference between amplification and the type of tissue analyzed. *In situ* hybridization reactions showed transcripts mostly expressed in the epithelium component in a heterogenic manner sometimes intense and others discrete in several cells populations in both tumoral and non-tumoral adjacent tissues, with no apparent relationship to cell morphology. In general, signal was more intense in the non-tumoral epithelium when compared to the neoplasia. These results suggest that PITX1 gene can

be involved with oral carcinogenesis and that its expression is reduced in most of the oral squamous cell carcinoma.

Key words: Homeobox Genes; Squamous Cell Carcinoma; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR; In Situ hybridization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 – Homeodomínio, mostrando a região da terceira hélice interagindo no sulco maior do DNA29
- Figura 2.2 – Esquema alternativo de regulação da atividade de algumas homeoproteínas. M: modificações pós traducionais; GTF: fator de crescimento geral, do inglês “general transcription factor”.30
- Figura 2.3 – Genes homeóticos da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*.....31
- Figura 2.4 – Esquema geral dos genes homeobox envolvidos no desenvolvimento embrionário da *Drosophila*. Notar os dois exemplos de genes que contém homeobox: o gene bicoid e o paired.....33
- Figura 4.1 – Gel de agarose a 1% mostrando o DNA plasmídeo e o DNA linearizado. PP= padrão de pares de base; PI= DNA plasmídeo; L1= linearização com enzima EcoR5; L2= linearização com enzima BamH1;57
- Figura 4.2 – Esquema mostrando a região codificante do gene PITX1 em humanos, bem como o fragmento de 455 pb contido no mRNA do gene. Observar homologia de 90% do transcrito entre humanos e camundongos.....58
- Figura 5.1 – Cromatograma contendo parte do transcrito do gene PITX1 enviado para seqüenciamento63
- Figura 5.2 – Gel de agarose a 1% mostrando amplificação nos casos 45, 46, 50, 53 e 54. C-= controle negativo; C+= controle positivo; Tn= tecido não tumoral adjacente; Tu= tumor; M= metástase; PP= padrão de pares de base; pb= pares de base63

Figura 5.3 – Localização de transcritos do PITX1 em tecidos não tumorais adjacentes ao tumor. (A) HE de tecido não tumoral. (B) hibridização *in situ* com sonda antisense, mostrando presença evidente de transcritos em toda extensão do epitélio não tumoral. (C) expressão mais branda de transcritos restrita a camada basal do epitélio de revestimento. (D) expressão mais intensa de transcritos restrita a camada basal do epitélio de revestimento. (E) corte mostrando diferença na distribuição de transcritos em várias camadas do epitélio de revestimento.64

Figura 5.4 – Localização de transcritos do PITX1 nos tumores. HE de tecido tumoral. (B) hibridização *in situ* do tumor com sonda antisense, mostrando transcritos em maior quantidade no epitélio não tumoral e sinal mais discreto no epitélio neoplásico. (C) detalhe da figura anterior, evidenciando uma ilhota epitelial bem marcada no interior da neoplasia, próxima ao epitélio de revestimento. (E) HE de tecido tumoral, mostrando ilhotas epiteliais e pérolas de queratina. (F) expressão de transcritos do gene em células ao redor das pérolas de queratina. Notar fragmento mais intenso na profundidade do mesmo caso65

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Dados referentes ao gene PITX151

Tabela 4.2- Volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg : micrograma

µl: microlitro

°C: graus Celsius

aa: aminoácidos

abd-B: gene da *Drosophila*, abdominal-B

AJCC: American Joint Committee on Cancer

BFT: do Inglês “backfoot”

BLAST: do Inglês “Basic Local Alignment Search Tool”, é um conjunto de programas de busca por similaridade de seqüências em bancos de dados

BMP: do Inglês “Bone morphogenetic protein” ou proteína morfogenética do osso

cDNA: do Inglês “complementary desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico complementar

DEPC: dietilpirocarbonato

Dlx: gene distal-less da *Drosophila*

DNA: do Inglês “desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleotídeos trifosfato

DTT: ditioneitol

E8.0 e E14,5: estágio 8.0 e 14.5 do desenvolvimento embrionário

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EMX: gene humano homólogo ao gene Emx (“empty spiracles”) da *Drosophila*

FGF: do inglês “fibroblast growth factor” ou fator de crescimento fibroblástico

FKHR: gene forkhead.

FSH: do Inglês “follicle-stimulating hormone”, hormônio folículo estimulante.

GAPDH: do Inglês “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”, gene constitutivo.

GnRH: do Inglês “Gonadotropin-releasing hormone”, hormônio liberador de gonadotropinas do hipotálamo

HOM-C: complexo homeótico da *Drosophila*

HOX: genes HOX (homeobox agrupados)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ISH: do Inglês “*in situ* hybridization”, reação de hibridização *in situ*

kb: kilobases, corresponde a 1000 pb

LH: do Inglês “luteinizing hormone”, hormônio luteinizante

MgCl₂: cloreto de magnésio

ml: mililitro

mM: milimolar

mRNA: do Inglês “messenger ribonucleid acid” ou ácido ribonucléico mensageiro

MSX: gene humano homólogo ao gene Msx (“muscle segmente homeobox”) da *Drosophila*

NBCCS: do Inglês “nevoid basocellular carcinoma syndrme”, síndrome do carcinoma nevíide basocelular

NCBI: do inglês “National Center for Biotechnology Information”

ng: nanograma

OTX: gene humano homólogo ao gene Otx (“orthodenticle”) da *Drosophila*

PAX: gene humano homólogo ao gene Pax (“paired”) da *Drosophila*

pb: pares de base

PCR: do Inglês “polymerase chain reaction”, técnica de reação em cadeia da polimerase

pH: potencial de hidrogênio

PITX1: gene humano “paired-like homeodomain transcription factor 1”, homólogo ao gene bicoid e paired da *Drosophila*

POMC: do Inglês “proopiomelanocortin”, hormônio proopiomelanocortina da pituitária anterior

POTX: do Inglês “Pituitary OTX related factor”

PTX1: do Inglês “pituitary homeobox”

ras: do Inglês “rat sarcoma virus”, proto-oncogene e proteína ras

RNA: do Inglês “ribonucleid acid” ou ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: do Inglês “reverse transcriptase polimerase chain reaction”, técnica de reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa

Shh: do Inglês “Sonic hedgehog”, proteína

TA: temperatura ambiente

TAE: tris-acetato EDTA

Tbx: gene T box

TNM: estadiamento TNM em que T= tumor; N= acometimento de linfonodos e M= metástases a distância.

UICC: do Francês “Union internationale Contre Le Cancer”

UVB: raios ultra-violetas B

Wnt: família de genes homólogos ao gene wg (wingless) da *Drosophila*, da contração em inglês “Wg + int”, gene

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Câncer de boca	21
2.1.1 Epidemiologia.....	22
2.1.2 Etiologia.....	23
2.1.3 Bases moleculares	24
2.1.4 Fatores Prognósticos.....	26
2.2 Genes homeobox – Considerações gerais	27
2.3 Desenvolvimento <i>versus</i> Câncer	33
2.4 Caracterização do gene PITX1	38
2.4.1 Aspectos funcionais e mecanismos regulatórios conhecidos	40
2.4.2 Participação em neoplasias	44
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

O gene PITX1 (paired-like homedomain transcriptional factor 1) pertence à família dos genes homeobox que são considerados genes atuantes no topo de hierarquias genéticas, pois são responsáveis por diferentes aspectos da morfogênese e diferenciação celular, estando expressos, sobretudo durante os períodos embrionários. O PITX1 está relacionado ao desenvolvimento das estruturas anteriores do embrião, em particular, cérebro e face, morfogênese da pituitária humana, membros inferiores e condições neoplásicas de alguns órgãos.

Sabe-se que existe um tênue limite entre a embriologia e a patologia. Nesse contexto, os genes homeobox aparecem como potenciais alvos na elucidação das bases moleculares do câncer. Estudos de biologia molecular já demonstraram alterações em genes relacionados ao desenvolvimento, como os homeobox, em diversas neoplasias malignas nos seres humanos. Porém, ainda não há nenhum registro mostrando a relação desses genes com a carcinogênese de boca.

Através do projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço” em parceria com o Instituto Ludwig foram encontrados genes homeobox que poderiam estar relacionados com o câncer de cabeça e pescoço de uma maneira geral. A partir desse estudo, foram selecionados aproximadamente 20 desses genes, dentre os quais o PITX1. Em adição a esse achado, esse gene também foi encontrado em microarray de câncer de boca.

Com base nesses dados, propusemo-nos a estudar a presença de transcritos do gene PITX1 em câncer de boca, mais especificamente em carcinomas epidermóides, já

que este tipo de neoplasia representa a mais freqüente dentre as neoplasias malignas que acometem a mucosa da boca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de boca

O carcinoma epidermóide representa a neoplasia maligna mais freqüente da boca, responsável por aproximadamente 95% do total de casos. Os outros 5% estão representados por linfomas, melanomas, sarcomas e por neoplasias malignas oriundas das glândulas salivares e do tecido odontogênico. O carcinoma epidermóide possui como sinônimo os termos carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular (BRASIL, 2002).

O perfil do paciente acometido pelo carcinoma epidermóide de boca está representado principalmente por homens mais velhos, acima dos 50 anos de idade e cujos fatores predisponentes mais aceitos são o hábito de fumar tabaco e ingerir bebidas alcoólicas, dentre outros (NEVILLE et al., 1998). Os locais mais freqüentemente atingidos são a língua, o lábio inferior e assoalho da boca, podendo correr também no rebordo alveolar, trígono retromolar, palato duro e mucosa jugal. As metástases envolvem principalmente os linfonodos cervicais superiores, pulmão, ossos e fígado (BRANDÃO; CAVALHEIRO; SONDERMANN, 2000).

O carcinoma epidermóide de boca possui uma apresentação clínica diversificada, variando de lesões ulceradas e infiltrativas a exofíticas. Outras lesões menos sugestivas podem ocorrer sob a forma de placas brancas ou áreas eritematosas, ou mesmo uma

mistura de ambas, o que torna a diferenciação dessas lesões de extrema importância para o diagnóstico correto (BIRMAN; SUGAYA, 2000).

O recurso diagnóstico de rotina utilizado é o exame histopatológico, o qual é obtido através de biópsia e se destina a analisar a morfologia tecidual. Atualmente estudos moleculares e imunoistoquímicos, associados aos dados histopatológicos e clínicos, têm contribuído para caracterização dos diversos eventos envolvidos no processo de carcinogênese, e visam também encontrar marcadores específicos que possam trazer contribuições não somente para o diagnóstico, como também para o prognóstico e terapêutica (MITTELDORF, 2000).

2.1.1 Epidemiologia

A incidência do câncer de boca é extremamente variável e representa menos de 5% do total da incidência no âmbito mundial, com as maiores taxas encontradas na Austrália e Canadá (INCA, s. d.). Outras áreas consideradas de alto risco são Índia, França, Melanésia, sul e sudeste da Ásia. Ainda hoje é considerado um problema de saúde pública em muitas partes do mundo (KOWALSKI; NISHIMOTO, 2000).

Segundo dados do INCA (2003), as neoplasias malignas foram consideradas a segunda causa de morte no Brasil no ano de 2000. As estimativas para o ano de 2003 apontaram para 402.190 novos casos de câncer de boca, sendo 267.980 deles somente na região sudeste e uma estimativa de 126.960 óbitos no país para esse mesmo ano, dos quais 68.990 no sudeste do país. Além disso, o câncer de boca foi

considerado a sexta neoplasia maligna mais freqüente em homens e a oitava mais freqüente em mulheres com a mesma proporção observada para os casos de óbitos.

2.1.2 Etiologia

Os agentes químicos carcinogênicos mais potentes e mais estudados são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, derivados da combustão incompleta (por isso alcatrões) do carvão mineral, tabaco e petróleo (BRASILEIRO FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998). No tabaco e na fumaça que dele se desprende podem ser identificadas cerca de 4700 substâncias tóxicas e dentre essas 60 apresentam ações carcinogênicas conhecidas por causarem mutações importantes na molécula de DNA (MAGALHÃES; MAGALHÃES, 2000). Sabe-se que o tabaco é o principal carcinógeno relacionado com o câncer de boca e que sua ação é potencializada pela ingestão de álcool, no entanto, não há nenhum estudo que confirme que o álcool isoladamente atue na carcinogênese de boca. É sugerido que o álcool impeça a reparação de DNA e que a sua associação com tabaco aumente consideravelmente as chances de desenvolvimento do câncer de boca quando em comparação com pessoas que somente fazem uso de tabaco (MAGALHÃES; MAGALHÃES, 2000).

O câncer de lábio possui uma etiopatogênese peculiar, ou seja, está associado com a exposição aos raios ultra-violetas B (UVB), ocorrendo, sobretudo, no lábio inferior devido à localização mais acessível para essas radiações. Outros fatores menos evidentes como carências nutricionais e infecções virais, dentre outros, têm sido

associados com o câncer de boca (NEVILLE et al., 1998; MAGALHÃES; MAGALHÃES, 2000), porém, são ainda controversos na literatura.

2.1.3 Bases moleculares

A patogênese do câncer representa um dos problemas mais complexos em biologia, pois muitos dos aspectos pelos quais uma célula normal é transformada em uma célula neoplásica permanecem inconclusivos. Há consenso de que o câncer representa uma doença obrigatoriamente genética, causada por mutações nas moléculas de DNA, desencadeadas por agentes agressores subletais em um indivíduo geneticamente susceptível. De maneira geral, há uma tendência da maioria dos cânceres afetarem pessoas de mais idade, já que o processo se desenvolve em múltiplas etapas, tais como iniciação, promoção e progressão (BRASILEIRO FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; MELTZER, 1995), apesar da constatação de casos cada vez mais precoces atualmente.

Os genes que participam ativamente desse processo são os oncogenes, os genes supressores de tumor, os genes de reparo de DNA e os genes da apoptose, pois estão intimamente relacionados com o ciclo celular e, portanto, com o processo de proliferação e diferenciação. Em condições normais esses genes atuam em conjunto para manter os níveis fisiológicos celulares adequados e quando sofrem mutações podem perder seus mecanismos de regulação, levando a célula a uma proliferação descontrolada, o que pode provocar o acúmulo de mutações, que vão se somando a

cada novo ciclo (BRASILEIRO FILHO; GUIMARÃES; BOGLIOLO, 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

No carcinoma epidermóide de boca ainda não há um perfil genético estabelecido quanto às alterações responsáveis pelo seu surgimento e progressão, devido à complexidade de mecanismos envolvidos e do dinamismo com que essas alterações se processam. Vários estudos já identificaram anormalidades genéticas presentes em cânceres de boca e de cabeça e pescoço de maneira geral, porém a importância dessa descoberta ainda não está clara. Existem evidências progressivas do envolvimento de aberrações genéticas nessas localizações envolvendo, em ordem de frequência, os cromossomos 9, 3, 17, 13 e 11, além de outras regiões cromossômicas ainda não identificadas (SCHULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). Muitos dos genes que já foram associados ao câncer de boca incluem os oncogenes ras (H-ras, K-ras e N-ras), myc, c-erbB, erbB-2 (DAS; MAJUNDER; DASGUPTA, 2000; NEVILLE et al., 1998; SABBAGA, 2000), alguns localizados no braço longo do cromossomo 11, tais como bcl-1, PRAD-1, int-2, hst-1, EMS1 e os supressores tumorais p53 (principalmente), E-caderinas (NEVILLE et al., 1998), PTEN (SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JR, 2002), e p16 (também denominado MTS1, CDKN2 ou INK4) (SABBAGA, 2000). A interpretação definitiva desses achados ainda é ponto de debate na literatura.

Atualmente, há uma tendência progressiva em associar genes responsáveis pelo desenvolvimento com a gênese de neoplasias malignas, em função de ambos os processos compartilharem mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação da célula, como ciclo celular e apoptose.

2.1.4 Fatores prognósticos

O conhecimento dos fatores prognósticos do câncer de boca é fundamental não apenas para o planejamento terapêutico adequado, mas também para oferecer ao paciente e seus familiares uma avaliação da situação e das perspectivas para controle da doença. Fatores como idade, manifestação da lesão, localização, estadiamento TNM, comprometimento de margens cirúrgicas, lesão primária, metástases linfáticas, além de tempo livre de doença, recidiva local e sobrevida (geralmente após um período de seguimento de 5 anos) são importantes parâmetros para essa avaliação (CERNEA; HOJAIJ, 2000). O sistema TNM serve para descrever a extensão anatômica da doença com base na pesquisa de três componentes: T - extensão do tumor primário, N - ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais, M - ausência ou presença de metástases à distância. A esses componentes são adicionados números de acordo com a gravidade da neoplasia maligna e esses aspectos assim reunidos servem para determinar o estágio clínico da doença de maneira que, quanto maior a classificação do estágio, pior o prognóstico para o paciente (UICC, 1992). Em relação ao câncer de boca, a classificação adotada pela UICC (1992) e pela AJCC (1997) são as mais seguras e aceitas pela comunidade científica.

Alguns autores tentaram definir quais seriam os fatores prognósticos mais confiáveis. Segundo Neville et al. (1998), o tamanho do tumor e a extensão da expansão metastática do carcinoma epidermóide de boca são os melhores indicadores prognósticos do paciente. Yuen et al. (2000) compararam o significado prognóstico do

diâmetro tumoral, comprimento, largura, espessura, área e volume com características clínico-patológicas em carcinomas orais de língua. De todos os parâmetros analisados, a espessura do tumor foi o único fator significativo de avaliação prognóstica com relação à recorrência local, metástase nodal e sobrevida dos pacientes portadores dessas lesões.

É importante ressaltar também que com o desenvolvimento de tecnologias sofisticadas de biologia celular e molecular, estará cada vez mais próxima a possibilidade de descoberta de marcadores genéticos confiáveis para o refinamento diagnóstico e acurácia terapêutica, podendo no futuro complementar ou até mesmo substituir os parâmetros prognósticos convencionais hoje utilizados (CERNEA; HOJAIJ, 2000).

2.2 Genes Homeobox: considerações gerais

Os genes homeobox são conhecidos como genes controladores do desenvolvimento e evolução (do inglês “master control genes”), pois atuam no topo de hierarquias genéticas regulando aspectos essenciais da embriogênese, morfogênese e diferenciação celular de uma série de organismos dos mais simples aos mais complexos. Esses genes são assim chamados por possuírem um segmento de DNA característico (o homeobox) constituído de 180 pb e que codifica uma proteína com 60 aa que tem função de fator de transcrição e é encarregada de interagir com genes alvos promovendo sua ativação, repressão ou mesmo modulação, o que está na

dependência do sinal recebido pela célula (MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997; NUNES et al., 2003). Essa porção protéica de 60 aa, chamada de homeodomínio, possui estrutura de hélice-volta-hélice e se caracteriza pela similaridade na seqüência de aa, pela especificidade ao DNA, representada pela sua 3ª hélice, e pelos padrões de expressão durante o desenvolvimento animal (figura 2.1). Sabe-se, por exemplo, que as proteínas codificadas pelos genes homeobox *Antennapedia*, *Bicoid* e *Paired* diferem em um resíduo aa colocado na posição 9 da hélice de reconhecimento do seu homeodomínio (EDELMAN; JONES, 1993).

Pouco se sabe sobre os genes alvos das homeoproteínas codificadas pelos homeobox. Sugere-se que essas homeoproteínas atuem em genes que codificam moléculas de adesão, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (CARÉ et al., 1996; LAWRENCE et al., 1996). Abate-Shen (2002) relatou que algumas dessas homeoproteínas, tais como *Otx2*, podem sofrer modificações pós-traducionais e interações com outras proteínas antes de atuarem como fatores de transcrição específicos (figura 2.2). Apesar dos efeitos biológicos marcadamente diferentes que ocorrem *in vivo*, os homeodomínios de várias proteínas homeobox diferentes compartilham grande similaridade seqüencial e podem se ligar, *in vitro*, de maneira e com similar afinidade a muitas áreas de DNA que contém a seqüência ATTA no núcleo (GUAZZI et al., 1998).

Evidências progressivas indicam que os retinóides, moléculas relacionadas à vitamina A, funcionam como importantes moléculas regulatórias do crescimento e diferenciação celular, tanto durante a embriogênese quanto no animal adulto e são também citados como um dos prováveis reguladores da expressão de genes homeobox. A característica principal dessa regulação parece ser sua habilidade de

ativar genes homeobox específicos, de maneira que a concentração do ácido retinóico pela qual a célula é exposta provavelmente tem influência em que tipo de gene homeobox será ativado. Além disso, essa ativação parece ocorrer em padrão colinear para os genes HOX (GUDAS, 1994).

Não se sabe se a expressão diferencial de um gene homeobox pode controlar a morfologia de estruturas complexas, porém recentes trabalhos sugerem que o gene homeobox *Ultrabithorax* da *Drosophila* gerencia o desenvolvimento de segmento através do controle de diferentes alvos em diferentes estágios evolutivos (AKAM, 1998).

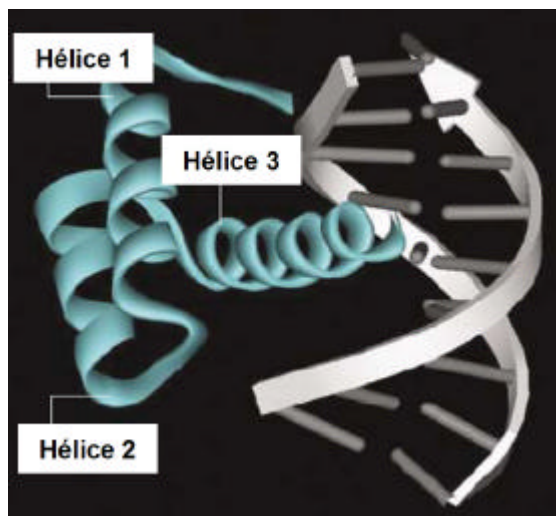


Figura 2.1 – Homeodomínio, mostrando a região da terceira hélice interagindo no sulco maior do DNA

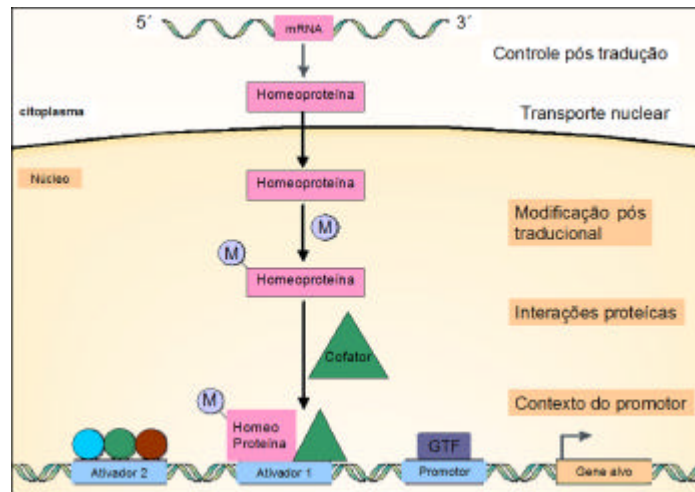


Figura 2.2 – Esquema alternativo de regulação da atividade de algumas homeoproteínas. M: modificações pós traducionais; GTF: fator de transcrição geral, do inglês “general transcription factor”

A descoberta dos genes homeobox trouxe a chave para o entendimento moderno do desenvolvimento e evolução, cujo controle genético é universal, já que foram encontrados de forma homóloga e com função semelhante em várias espécies, de fungos e vegetais a humanos (GEHRING, 1998). O nome homeobox foi dado a esse grupo de genes porque foram descobertos a partir dos genes homeóticos da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (figura 2.3), responsáveis pelo fenômeno conhecido como homeose quando sofrem mutação. A homeose consiste na transformação de uma estrutura corporal em outra. Exemplo típico ocorre na mutação do gene Antennapedia, acarretando a formação de patas no lugar de antenas. Em condições normais, os genes homeóticos especificam o eixo antero-posterior da *Drosophila*, contribuindo fortemente para a correta localização de suas estruturas corporais (DE ROBERTIS; OLIVER; WRIGHT, 1990; GEHRING, 1998). Sabe-se que nos vertebrados os genes homólogos ao complexo homeótico da *Drosophila* (HOM-C) estão dispostos de maneira agrupada e

são chamados de HOX. Em humanos estão representados por 39 membros dispostos em quatro grupos (A, B, C e D), localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2, respectivamente, e contém 9 a 11 genes em cada um desses grupos. A expressão dos genes HOX é iniciada na gastrulação e segue um padrão de colinearidade temporal e espacial, ou seja, os genes HOX da região 3' são expressos precocemente, seguidos progressivamente pelos genes da região 5', que são expressos mais tardiamente e controlam regiões mais posteriores do desenvolvimento embrionário (CILLO et al., 1999; GOODMAN, 2002).

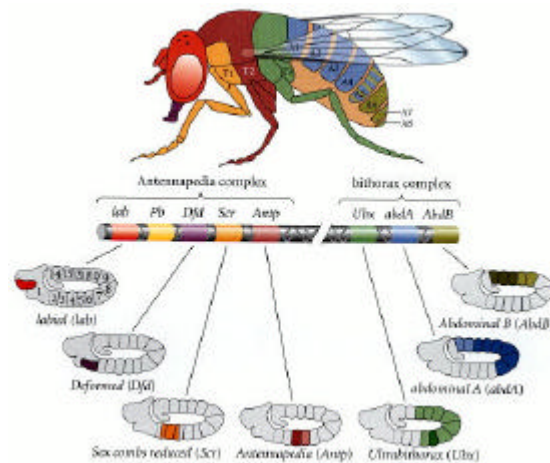


Figura 2.3 – Genes homeóticos da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*

A seqüência homeobox também foi verificada em genes não homeóticos da *Drosophila* e que parecem estar a montante da sua cascata de sinalização. Tais genes representam a classe dos homeobox não agrupados, pois estão dispersos pelo genoma. Nesse caso, vários genes como os de efeito materno, os “gap”, os “pair-rule” e os genes de polaridade de segmento podem conter a seqüência homeobox (GILBERT, 2000) (figura 2.3). Vários genes homeobox não agrupados continuam sendo descobertos, porém os mais conhecidos e estudados atualmente são os genes Pax,

Msx, Emx, Otx e Dlx assim chamados devido à homologia com os genes da *Drosophila* “paired”, “muscle segment homeobox”, “empty spiracles”, “orthodenticle” e “distal-less”, respectivamente (CILLO et al., 1999; THOMAS et al., 2000).

Durante o desenvolvimento os genes homeobox MSX estão expressos em tecidos que estão sofrendo interações epitélio-mesenquimais podendo ser induzidos por fatores de crescimento, como BMP e FGFs (CILLO et al., 1999). Os genes PAX estão, em humanos, representados por 9 genes e têm demonstrado expressão restrita no aspecto temporal e espacial do desenvolvimento (EPSTEIN et al., 1994). Esses genes estão expressos, sobretudo, no sistema nervoso central, mesoderma paraxial e seus derivados, e também participam do desenvolvimento dos olhos e trato urogenital (CILLO et al., 1999; ECCLES et al., 2002; WAWERSIK; MAAS, 2000). Membros da família Dlx, juntamente com membros da família Msx regulam o desenvolvimento e mineralização de tecidos, incluindo ossos, cartilagem e dente (CILLO et al., 1999; THOMAS et al., 2000). Genes que controlam o desenvolvimento do cérebro incluem os Otx1 e 2 e os Emx1 e 2 (BONCINELLI, 1997; CILLO et al., 1999; QIU et al., 1996; MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997). Boncinelli, Gulisano e Broccoli (1993) demonstraram a expressão progressiva dos genes Otx e Emx no cérebro, de maneira que o Otx2 era primeiramente expresso, seguido pelos genes Otx1 e Emx2, e finalmente pelo Emx1, sugerindo que esses quatro genes poderiam estabelecer e/ou sinalizar regiões do cérebro em um discreto processo progressivo. Adicionalmente, a homeoproteína do gene Otx2 também já foi relacionada com regulação de expressão hormonal atuando sobre GnRH (KELLEY et al., 2000).

O gene PITX1 é um gene homólogo ao gene *bicoid* da *Drosophila* (LANCTÔT; LAMOLET; DROUIN, 1997). Nesse organismo, o gene *bicoid* funciona como um

organizador do padrão corporal anterior, atuando no início da cascata genética que especifica as estruturas anteriores do embrião (OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man: PITX1, n.602149). Além de ser homólogo do gene bicoid, o gene PITX1, é também homólogo do gene paired da *Drosophila* (Figura 2.3).



Figura 2.4 – Esquema geral dos genes envolvidos no desenvolvimento embrionário da *Drosophila*. Notar os dois exemplos de genes que contém homeobox: o gene bicoid e o paired

2.3 Desenvolvimento *versus* Câncer

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* serviu como modelo genético valioso para o estudo inicial de importantes aspectos do desenvolvimento. Verificou-se que um grande número de genes presentes na embriogênese e desenvolvimento desses organismos possui homólogos em vertebrados, com interessante grau de conservação.

Além disso, muitos desses genes originalmente identificados quanto ao seu papel no desenvolvimento embrionário, são também importantes no controle pós-natal do crescimento celular e diferenciação (GAILANI; BALE, 1997).

Já se sabe que os aspectos moleculares relacionados ao desenvolvimento como proliferação, diferenciação e apoptose também são relacionados ao processo de carcinogênese. Nesse aspecto, Gailani e Bale (1997) relataram que o homólogo humano do gene *patched* da *Drosophila* estava relacionado com a síndrome do carcinoma nevóide basocelular (do inglês NBCCS), a qual origina inúmeros carcinomas basocelulares. Mutações nesse gene ocorrem tanto nas formas hereditárias quanto esporádicas dessas lesões. Sabe-se que o gene *patched* da *Drosophila* se relaciona com a via de sinalização do gene *hedgehog*, que possui grande importância na determinação do destino celular em múltiplas estruturas do desenvolvimento do embrião. A cascata de sinalização da família Wnt também tem importante papel no desenvolvimento e sua desregulação tem implicações na transformação neoplásica (VAN ES; BARKER, CLEVERS, 2003). Liang et al. (2003) demonstraram que o gene *Wnt5a*, membro dessa família, exibe perda de função em leucemias e linfomas de células B.

Vários outros genes primordiais para o desenvolvimento, como os homeobox, também foram e estão sendo progressivamente associados a cânceres em humanos, pois se mostram desregulados em uma gama de neoplasias malignas, incluindo aquelas de pele, colon, próstata, mama, ovário, rim, pulmão, tireóide, além de leucemias (ABATE-SHEN, 2002; ANBAZHAGAN; RAMAN, 1997; BONCINELLI, 1997; CILLO et al., 1999; CILLO et al., 2001; DASH; GILLILAND, 2001; FORD, 1998; LAWRENCE et al., 1996; MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997; NAKAMURA et al., 1999;

NUNES et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2004). De maneira geral, as conseqüências dos genes homeobox para o processo de carcinogênese podem ser interpretadas como uma extensão de sua função normal (ABATE-SHEN, 2002). Falaremos a seguir, de forma breve, sobre a participação de genes homeobox em algumas neoplasias. Essa participação, no entanto, é mais encontrada na literatura associada com os genes HOX, ou seja, com os genes homeobox agrupados, apesar de alguns membros da família de genes não agrupados terem uma associação com a carcinogênese efetivamente mais consistente.

A família de genes PAX representa, dentro dos homeobox, aquela cuja associação com o câncer está mais bem estabelecida. Essa família possui nove genes todos expressos no sistema nervoso central, mesoderma paraxial e seus derivados. Esses genes apresentam um domínio comum de ligação ao DNA, o paired box (CILLO et al., 1999), no entanto nem todos os seus membros são da família homeobox, já que alguns deles não possuem a região do homeodomínio em suas proteínas. Maulbecker e Gruss (1993) estudaram o potencial oncogênico de genes Pax, demonstrando que esses genes eram capazes de induzir oncogênese em camundongos ao atuarem como proto-oncogenes. Essa indução era dependente do domínio paired funcional e não necessitava da presença do homeodomínio para essa atuação. Dessa forma, não somente as proteínas Pax3 e Pax6, que além de possuírem o domínio paired, possuem também homeodomínio, como também Pax2 e Pax8 que contém apenas homeodomínios residuais e o Pax1, que não possui homeodomínio, foram capazes de induzir tumorigênese em camundongos. Além disso, em rabdomyosarcomas alveolares já foram encontradas fusões protéicas t(2;13) entre o gene PAX3 e FKHR (forkhead gene) (CILLO et al., 1999; MELTZER, 1995).

Já foi também relatada relação entre homeoproteínas MSX e a cascata de sinalização ras em leucemias (TAKAHASHI et al., 1997), porém a maioria dos outros trabalhos sobre membros dos genes homeobox não agrupados, que se apresentam em situação desregulada, estão associados com anormalidades e síndromes diversas (QIU et al., 1996; WUYTS et al., 2000).

Guazzi et al. (1998) relataram interações regulatórias positivas entre as proteínas humanas HOXB1, HOXB2 e HOXB3 e um fragmento de DNA do gene *Otx2* localizado a sua montante em carcinomas de células embrionárias e sugeriram que essas proteínas poderiam desempenhar papel importante no refinamento da expressão precoce do gene *Otx2 in vivo*.

Foi proposto que fatores de crescimento representam alvos normais da ativação de genes HOX durante a embriogênese. Exemplo típico ocorre em melanomas, cuja hiperexpressão do HOXB7 ativa constitutivamente o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), favorecendo a proliferação celular descontrolada (CARÉ et al., 1996). O gene HOXB7 mostrou-se também expresso em câncer de mama e nesse caso foi associado com pobre prognóstico (HYNDMAN et al., 2002).

Chang et al. (1998) estudaram a amplificação de transcritos de genes Hox tanto na pele normal de camundongos adultos como em papilomas e carcinomas, através do uso de iniciadores degenerados. Seus resultados mostraram que 25 dos 39 genes Hox conhecidos foram amplificados no tecido normal. Ao contrário, nos papilomas e carcinomas, houve isolamento preferencial de clones do HoxA7 e HoxB7 com concomitante silenciamento de todo o locus do grupo HoxD, sugerindo que a maioria dos membros do grupo Hox estão expressos na pele normal de camundongos, enquanto seu repertório é substancialmente limitado em papilomas e carcinomas.

Rieger et al. (1994) observaram que a expressão do gene HOXC4 em queratinócitos de pele normal e em tumores de pele estava correlacionada com a diferenciação celular. Utilizando RT-PCR e hibridização *in situ*, os autores encontraram expressão predominante do gene em queratinócitos diferenciados, ao passo que em células mais indiferenciadas (neoplásicas), o gene mostrava-se com baixa expressão

Takahashi et al. (2004), através da comparação de tecidos tireoidianos normais e linhagens celulares de câncer de tireóide mostraram alteração na expressão de alguns genes HOX de maneira órgão-específica, especialmente para aqueles da família Abd-B, que se mostraram mais desregulados nesse tipo de neoplasia que os outros genes Hox.

Anormalidades em genes homeobox também estão relacionadas a carcinogênese via anomalias congênitas. Nesse caso, mutações nos genes Hoxa4, Hoxa5 e Hoxa6 em camundongos transgênicos estão relacionadas ao surgimento de anormalidades esqueléticas que levam à transformação da sétima vértebra cervical em um par de costelas que lembram a primeira vértebra torácica. Essa alteração, similar a conhecida costela cervical em humanos, é vista em aproximadamente 2 a 6% dos indivíduos e está associada à formação de diversos tumores em crianças, incluindo neuroblastoma, tumor cerebral, sarcoma de partes moles, leucemia e tumor de Wilm, cuja expressão gênica desses tumores também inclui os mesmos genes relacionados à costela cervical (Hoxa4, Hoxa5 e Hoxa6) (ANBAZHAGAN; RAMAN, 1997).

Em adição a expressão desregulada de genes homeobox em tumores sólidos, alguns desses genes estão freqüentemente translocados em leucemias. Nesse caso, fusões de proteínas do “nucleo pore complex 98” (NUP98) com proteínas codificadas por genes homeobox foram encontradas atuantes em leucemias, como por exemplo,

NUP98/HOXA9, NUP98/HOXD13 e NUP98/PMX1, associadas com t(7;11), t(2;11) e t(1;11) respectivamente, (DASH; GILLILAND, 2001; NAKAMURA et al., 1999).

Apesar de trabalhos sobre os genes HOX dominarem claramente a literatura sobre essa temática, ainda não está evidente se esse dado reflete um significado particular na carcinogênese ou se apenas representa o fato desses genes estarem sendo estudados mais extensivamente do que as outras classes de genes homeobox (ABATE-SHEN, 2002).

2.4 Caracterização do gene PITX1

O PITX1 (paired-like homeodomain transcription factor 1) é um gene relacionado a família *bicoid* de genes que contém o homeobox (LANCTÔT; LAMOLET; DROUIN, 1997). Na *Drosophila*, o gene *bicoid* funciona como um organizador do padrão corporal anterior, atuando no início da cascata genética que especifica as estruturas anteriores do embrião (INTERACTIVE FLY, s. d.). Esse gene, assim como seus homólogos na *Drosophila*, parece ter um papel importante no desenvolvimento das estruturas anteriores e, em particular, do cérebro e face (OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man: PITX1, n.602149). O PITX1 também é um membro da família *paired* de fatores de transcrição contendo homeobox, juntamente com o PITX2 e PITX3. Enquanto os PITX1 e PITX2 têm funções complementares no desenvolvimento de diversas estruturas derivadas do estomódeo e durante a formação dos membros inferiores, o PITX3 está relacionado ao desenvolvimento de estruturas neurais e lentes (LEBEL et al., 2001;

SEMINA; REITER; MURRAY, 1997). Apesar da complementaridade funcional do PITX1 e 2 no desenvolvimento dessas estruturas, mutações no PITX2, têm sido relacionadas à assimetria de órgãos internos e à Síndrome de Rieger, uma desordem autossômica dominante, caracterizada por anormalidades oculares, craniofaciais e umbilicais (LU et al., 1999).

O Pitx1 foi clonado e caracterizado inicialmente no camundongo como um gene capaz de codificar proteínas com função de fatores de transcrição ativadoras do gene da proopiomelanocortina (POMC) na pituitária e por isso também é chamado de PTX1 (“pituitary homeobox 1”) (LAMONERIE et al., 1996). É conhecido também como POTX (“pituitary OTX related factor”) e BFT (“backfoot”) em função de sua relação com o gene OTX e com a morfogênese dos membros inferiores, respectivamente. Somente em 1997, o gene foi mapeado por grupos de pesquisadores independentes da Califórnia e Canadá. Tais estudos mostraram que o gene estava localizado no locus 5q31 em humanos e no cromossomo 13 em camundongos (CRAWFORD et al., 1997; SHANG et al., 1997). Além disso, Crawford et al. (1997) clonaram e sequenciaram o gene PITX1 em humanos e mostraram que os limites íntron/exon estavam conservados em camundongos e humanos e as prováveis proteínas codificadas em ambas as espécies compartilhavam 100% de homologia em seu homeodomínio, o qual mostrava-se 88% e 97% conservado em suas regiões N- e C- terminais, respectivamente.

O gene PITX1 possui quatro exons, um deles ausente na espécie humana, e uma região cromossômica de aproximadamente 7.3 kb. Seu transcrito possui em média 2.3 kb (NCBI: Nucleotide NM_002653) e codifica uma proteína com 314 aa (NCBI: protein NP_002644), dentre os quais 60 deles correspondem ao homeodomínio. O homeodomínio contém uma lisina na posição 9 da hélice de reconhecimento (hélice 3

na posição 60) que estrategicamente se coloca no sulco maior do DNA e se torna um determinante da região específica que se liga ao DNA reconhecendo a dupla CC do gene alvo. Tal resíduo de lisina define a subfamília relacionada ao gene *bicoid* da *Drosophila*, incluindo os Otx-1 e -2 (Interactive Fly, *Drosophila: bicoid* - Evolutionary Homologs).

Algumas das propriedades do PITX1 foram definidas principalmente a partir de estudos mostrando a ativação de genes alvos na glândula pituitária de camundongos principalmente, bem como interações específicas com genes responsáveis pela correta especificação das estruturas dos membros inferiores.

2.4.1 Aspectos funcionais e mecanismos regulatórios conhecidos

Atualmente, os conhecimentos adquiridos a respeito dos aspectos funcionais, mecanismos regulatórios e vias de sinalização dos diferentes genes estão sendo possíveis através do avanço da biologia celular e molecular. O advento do DNA recombinante permitiu a clonagem e caracterização de genes específicos. Além disso, estudos em camundongos knockouts permitiram avaliar as funções de genes envolvidos em importantes processos fisiológicos. Vários estudos utilizando essas técnicas foram realizados, principalmente em camundongos, para elucidar o papel do gene PITX1 no desenvolvimento e o que se sabe no momento ainda é muito limitado, considerando que esses estudos começaram a partir da década de 90. Os dados disponíveis revelam que a expressão do gene PITX1 está sendo relacionada,

sobretudo, ao desenvolvimento de estruturas oriundas do estomódeo, como o 1º arco branquial e bolsa de Rathke (primórdio da glândula pituitária anterior) e ao desenvolvimento dos membros inferiores.

Ainda não está claro se o desenvolvimento de estruturas anteriores da cabeça resulta de um plano segmentado, como aquele observado para os homeobox agrupados, no entanto, essa idéia foi proposta com base no padrão de expressão de genes contendo homeobox não agrupados, incluindo membros da família Dlx, Otx e Emx. Lanctôt, Lamolet e Drouin (1997) estudaram a expressão do Pitx1 durante a embriogênese de camundongos e galinhas através de hibridização *in situ* e sugeriram que o gene define o ectoderma do estomódeo, situado anteriormente aos neurômeros que parecem constituir unidades de um plano segmentado que dirige a formação da cabeça. Observaram que, na cabeça em desenvolvimento, a expressão do Pitx1 ocorre primeiramente no estomódeo em E8.0 e é mantida até originar o epitélio da cavidade oral, do primeiro arco branquial e subseqüentemente de todos os seus derivados, incluindo epitélio da nasofaringe, palato, língua, pituitária anterior, epitélio olfatório, glândula submandibular e epitélio dental. O padrão de expressão do gene no ectoderma do estomódeo também foi observado em outros trabalhos (GOODYER et al., 2003; LANCTÔT; GAUTHIER; DROUIN, 1999; LANCTÔT et al., 1999).

Estudos de deleção gênica do Pitx1 mostraram alterações nos membros inferiores e defeitos em derivados do 1º arco branquial, incluindo fenda palatina (LANCTÔT et al., 1999; SZETO et al., 1999), micrognatia, língua fissurada (LANCTÔT et al., 1999) e alterações em tipos celulares da pituitária anterior em formação (SZETO et al., 1999). Em relação ao desenvolvimento dentário, foi verificado em camundongos que o padrão de expressão dos genes Pitx1 e 2 na região da mandíbula em desenvolvimento, assim

como no epitélio dental são regulados por efeitos antagonistas de moléculas sinalizadoras do epitélio como *fgf8* e *Bmp4*, de maneira a definir o padrão de expressão desses genes nessas regiões. Enquanto *fgf8* é regulador positivo, o *Bmp4* age negativamente (AMAND et al., 2000).

O papel do *PITX1* está mais bem esclarecido na glândula pituitária. Na glândula em desenvolvimento, o gene está expresso em praticamente todas as células pituitárias, porém de maneira diferencial nas diversas linhagens tanto nos níveis de RNA mensageiro como de proteína (LANCTÔT; GAUTHIER; DROUIN, 1999). Atua ainda em função sinérgica com outros fatores de transcrição como *fgf8*, *Shh*, *Bmp4* e *Wnt* em tipos celulares específicos da pituitária anterior em formação (SZETO et al., 1999). O gene também se mostra atuante na glândula adulta e foi inicialmente ligado à expressão nas células corticotróficas, exercendo transcrição celular específica no gene da *POMC* (LAMONERIE et al., 1996). No entanto, sabe-se agora que sua ação é muito mais profunda, pois vários promotores pituitários específicos cortêm pelo menos um provável sítio de ligação ao *Pitx1*, incluindo aqueles para a subunidade α (α -SU) (SKELLY et al., 2000) e para subunidades β como o LH e FSH (TREMBLAY; DROUIN, 1999; KUROTANI et al., 1999; ZAKARIA et al., 2002), o que significa que a maioria dos promotores genéticos que codificam hormônios são ativados em parte devido a expressão desse gene. Além disso, sua atuação ao longo da glândula parece ser bem mais complexa, envolvendo a interação com outros fatores de transcrição essenciais na regulação hormonal (TREMBLAY; LANCTÔT, DROUIN, 1998; TREMBLAY et al., 1999; LAMOLET et al., 2001).

Goodyer et al. (2003) estudaram a atividade promotora do *Pitx1* in vivo e seus mecanismos de autoregulação, definindo uma região promotora de 4.2 kb do gene que

direcionava a expressão dentro do estomódeo e 1º arco branquial em camundongos transgênicos. Esses autores mostraram que três membros da família Pitx, como os Pitx1, Pitx1b e Pitx2, assim como o fator relacionado Otx, estimulavam significativamente a atividade promotora do Pitx1 de maneira dose-dependente. No entanto, essa atividade autoregulatória positiva do Pitx1 estava na dependência do perfeito funcionamento da atividade ligadora de DNA da proteína e ativação de seu domínio C-terminal.

Diversos estudos com metodologias variadas mostraram que o Pitx1 pode também ter um papel importante na especificação da identidade dos membros inferiores (LANCTÔT; LAMOLET; DROUIN, 1997; LANCTÔT et al., 1999; SHANG; LUO; CLAYTON, 1997) e que parece agir em conjunto com outros genes na morfogênese desses membros. Marcil et al. (2003) sugeriram que o Pitx1 e Pitx2 estão intimamente relacionados e são implicados em padronizar os derivados do mesoderma da placa lateral posterior: o Pitx1 especificando a identidade do membro inferior e o Pitx2 determinando a lateralidade. Adicionalmente, o gene atua em conjunto com outros genes, dentre eles, o Tbx4 (SZETO et al., 1999; LOGAN; TABIN, 1999) e os HoxC10 e HoxC11 na codificação de fatores de transcrição expressos no desenvolvimento dos membros inferiores (LOGAN; TABIN, 1999).

A expressão do PITX1 na parte anterior do embrião e no mesoderma da placa lateral posterior já está bem estabelecida. Falta agora definir com mais exatidão todas as moléculas envolvidas na via de sinalização desse gene, qual sua definitiva participação na morfogênese dessas e de outras estruturas, quais os mecanismos regulatórios que atuam na sua expressão e como a sua desregulação pode interferir em

processos fisiológicos importantes que podem levar inclusive ao surgimento de neoplasias.

2.4.2 Participação em neoplasias

Algumas pistas da participação do PITX1 em neoplasias malignas já foram levantadas. O projeto Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço em parceria com o Instituto Ludwig selecionou aproximadamente 20 genes homeobox possivelmente relacionados com o câncer de cabeça e pescoço de uma maneira geral, dentre os quais o PITX1 fazia parte dos possíveis candidatos. Já em relação ao câncer de boca mais especificamente, a pista encontrada foi um estudo de microarray realizado por Moriya et al. (2003). Para analisar a expressão gênica em câncer oral, esses autores produziram um cDNA microarray utilizando amostras de carcinoma epidermóide de boca. Nesse estudo, foram identificados 53 genes, 7 deles com alta expressão (do inglês “upregulated”) e 46 com baixa expressão (do inglês “down-regulated”), que estavam diferencialmente expressos em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca quando comparados com a mucosa normal. Desses genes identificados, o PITX1 estava incluído e mostrava-se com baixa expressão.

A região onde o gene PITX1 está localizado em humanos (5q31) foi considerada área potencial para perda de heterozigose em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (BEDER et al., 2003), com a perda nessa região sendo relatada inclusive em carcinoma de esôfago (PERALTA et al., 1998).

Vários estudos já demonstraram a amplificação de transcritos do PITX1 em condições neoplásicas benignas da pituitária (CHEN; SUKUMAR, 2000; TAHARA et al., 2000). Pellegrini-Bouiller et al. (1999) caracterizaram a expressão de genes relacionados à família paired (PITX1, 2 e 3) na pituitária normal e em diferentes tipos de adenomas pituitários humanos. Os autores detectaram um transcrito do PITX1 de 2.5 kb tanto no tecido normal da glândula quanto numa série de 60 adenomas pituitários. Já Skelly et al. (2000) observaram uma redução maior que 50% na expressão do PITX1 assim como na secreção da subunidade α quando comparada com aquela do gene constitutivo GAPDH nos 6 adenomas corticotróficos em uma série de 34 adenomas pituitários avaliados.

Pelo exposto, verificamos que os estudos sobre a participação do gene PITX1 em neoplasias estão em fase inicial. Frente à carência de estudos sobre esse tema e aos indícios de sua possível participação em neoplasia maligna de boca, propusemo-nos a verificar a presença de seus transcritos nesse tipo de lesão por meio de técnicas de biologia molecular.

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a presença de transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca e tecidos não tumorais adjacentes, através de amplificação por RT-PCR e localização celular por hibridização *in situ*, analisando sua possível relação com a morfologia das células neoplásicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram obtidos fragmentos de tecido tumoral e tecido não tumoral adjacente de 29 pacientes provenientes do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) previamente diagnosticados como portadores de carcinoma epidermóide de boca. A obtenção do material, sem prejuízo para o tratamento global do paciente e através de parâmetros cirúrgicos, foi autorizada pelo comitê de ética do Hospital das clínicas (Anexo A) e por documento de aceite dos pacientes.

4.2 Obtenção dos espécimes

Durante o ato cirúrgico para remoção da lesão foi retirado fragmento da porção interna da neoplasia, bem como porção não tumoral de uma região adjacente. Esses fragmentos foram armazenados separadamente em paraformaldeído a 4% para cada paciente. Parte do material de cada um desses fragmentos foi destinada a extração de RNA para as reações de RT-PCR e para o preparo das sondas necessárias para as

reações de ISH. Outra parte do material foi processada para embebição em OCT e então ser submetida a cortes em criostato para confecção das lâminas a sofrerem a ISH. Esses espécimes foram disponibilizados para a pesquisa por cirurgiões de cabeça e pescoço do HC responsáveis pela cirurgia e trazidos ao nosso laboratório por alunos da Liga de Neoplasias Malignas da Mucosa Bucal (LIMB) da FOU SP, e ficaram armazenados em um freezer a -80°C .

Os dados clínicos dos pacientes também foram coletados, sempre que possível, por alunos da Liga (Anexo B). A participação desses alunos estava de acordo com as normas do hospital e com a devida autorização do chefe do serviço de cirurgia de cabeça e pescoço.

4.3 Extração do RNA

Foi obtido RNA total dos fragmentos de tecido tumoral e não tumoral adjacente selecionados para esse fim, utilizando-se o método do TRIzolTM conforme instruções do fabricante (GIBCO BRL – Invitrogen). Esses fragmentos foram manipulados separadamente da seguinte maneira: o fragmento foi transferido para um almofariz de porcelana contendo nitrogênio líquido (N_2) e macerado com um pistilo até pulverização completa. Adicionou-se, em seguida, 1ml de TRIzolTM para cada 100mg de tecido. O material obtido após homogeneização foi então transferido para tubos tipo Eppendorf de 1,5ml, mantido durante cinco minutos a temperatura ambiente (TA) e homogeneizado por três minutos, quando foram adicionados 200 μl de clorofórmio e o

tubo agitado por 15 segundos. Após manter o tubo em repouso durante três minutos, este foi centrifugado durante 15 minutos a 10000 rpm em 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo. A este último tubo foram adicionados 500µl de isopropanol, quando foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima durante 10 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo foi então lavado com 1ml de etanol 75%, agitado por 15 segundos, centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm em 4°C e o álcool então desprezado. O corpo de fundo foi secado a 37°C por 2 minutos e em seguida dissolvido em 30µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma). O RNA obtido foi submetido à leitura em espectrofotômetro (Beckmann DU-640), e utilizado quando se obteve uma razão do OD 260 e 280 entre 1.8 e 2.1.

A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de integridade. Para isso, 5µl de RNA foram misturados a 15µl de tampão de amostra [10ml formamida, 3,5ml formaldeído 37% e 2ml MOPS (MOPS 0,2M pH7,0, acetato de sódio 50mM, EDTA 5mM pH8,0)] e 5µl de tampão de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, bromofenol blue 0,4% e água DEPC q.s.p.20ml), e aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio 0,5mg/ml. A integridade foi considerada ótima quando as bandas 28S e 18S de rRNA estavam nítidas e intensas, numa razão de 2:1. os procedimentos descritos acima, bem como os relatados a seguir, foram efetuados em condições livres de Rnase.

4.4 RT-PCR

Após obtenção do RNA de cada amostra realizou-se a síntese de cDNA através da técnica RT-PCR (Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction, Invitrogen, Carlsbad, CA). O protocolo, segundo instruções do fabricante, foi feito com utilização da enzima Superescript II (Invitrogen) da maneira descrita a seguir.

Após quantificação, a concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ do RNA foi calculada através da fórmula $\text{OD} \times \text{Fd}$ (fator de diluição) $\times 40/1000$. A partir disso, determinou-se o volume de RNA que continha 4 μg e a esse volume foram adicionados 2 μl de OligoDT (Invitrogen) e quantidade de água DEPC alcalina necessária para completar um volume total de 20 μl . Os tubos foram então aquecidos a 70°C por 10 minutos, resfriados em gelo picado por 5 minutos e tratados com 4 μl de solução tampão apropriada (5x buffer), 2 μl de DTT (Dithilthreitol) e 1 μl de dNTP a 10mM (deoxynucleoside triphosphate). Os tubos foram agitados por 15 segundos e mantidos a 25°C durante 10 minutos e então aquecidos por 2 minutos a 42°C. Aos tubos foi adicionado 1 μl da enzima Superescript II (Invitrogen) e em seguida mantidos a 4°C durante 50 minutos. A reação foi finalizada a 70°C por 15 minutos a fim de neutralizar a enzima. Os cDNAs, assim obtidos, foram armazenados em freezer a -20°C para uso.

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction, Invitrogen) através de iniciadores específicos para o gene PITX1. Os iniciadores utilizados foram confeccionados utilizando-se o programa Gene Tool 1.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá, <http://biotools.com>) tomando-se por base a seqüência

do gene obtida do banco de dados do NCBI (Nucleotide NM_002653). A tabela 4.1 mostra os dados referentes ao gene PITX1 obtidos do banco de dados, bem como a seqüência dos iniciadores e o tamanho do produto por ela amplificado.

Tabela 4.1- dados referentes ao gene PITX1

Gene	PITX1
Nucleotide	<u>NM_002653</u>
LocusID	5307
Posição cromossômica	5q31
Iniciador senso	5' aaggggcccaggacagtgg 3'
Iniciador anti-senso	5' gctgagaacatggactgacga 3'
Produto	455 pb (nucleotídeo 610 ao 1064)

As reações de PCR foram realizadas com 48 ciclos e temperatura de associação de 68 graus. Aos tubos Eppendorf foram acrescentados os seguintes reagentes: cDNA, iniciadores senso e antisenso, dNTP, tampão (10X), magnésio, enzima Taq polimerase (Invitrogen do Brasil) e água destilada/autoclavada para completar 25µl de solução. A tabela 4.2 mostra os volumes e as respectivas concentrações dos reagentes utilizados nessas reações.

Tabela 4.2- volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR

Componente	Volume	Concentração final
Tampão 10x	2,5 µl	1x
Magnésio (MgCl ₂)	1,25µl	2,5mM
DNTP (10mM cada nt)	0,6 µl	240 µM
Iniciador senso	0,5 µl	5 pmol
Iniciador anti-senso	0,5 µl	5 pmol
Enzima Taq DNA polymerase	0,4 µl	2 U/25 µl
cDNA	0,5 µl	4µg/µl

Os tubos com os reagentes já citados foram levados ao termociclador PTC-100 Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc), no qual foram submetidos a um pré-tratamento de denaturação à 94°C por 3 minutos, seguidos por 48 ciclos de reação. Nesses ciclos ocorreu uma denaturação de 94°C por 1 minuto, associação dos iniciadores a 68°C (TM) por 50 segundos, extensão enzimática à 72°C por 50 segundos, após o ciclo final houve uma extensão adicional de 7 minutos a 72°C.

Os resultados das reações foram, então, avaliados em gel de agarose a 1% (Invitrogen) contendo brometo de etídio e visualizados em um transiluminador com luz UV, e a seguir fotografados em uma câmera Polaroid para documentação.

As reações de PCR acima discriminadas foram otimizadas inicialmente em embrião de camundongo (E14,5) e, a partir disso, utilizou-se o caso 20 como controle positivo, pois desde o início mostrou forte e consistente amplificação. Além disso, todos os cDNAs utilizados nas reações foram também amplificados com o gene constitutivo da β -actina a fim de confirmar sua efetividade. A otimização das reações foi baseada no "Troubleshooting for PCR" (<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html>).

4.5 Subclonagem e Transformação

O transcrito amplificado por RT-PCR do caso 33 foi inserido em vetor pCR 2.1 utilizando-se o sistema TOPO TA de clonagem (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A solução de clonagem foi preparada em um tubo através da mistura de 2 μ l do produto de PCR fresco, 1 μ l de solução salina apropriada, 1 μ l do vetor TOPO e 2 μ l

de água estéril. Dessa maneira, 30 µl das células *E. coli* fornecidas com o kit (One Shot), ficaram incubadas em gelo por 30 minutos com 2µl dessa solução de subclonagem preparada, e a seguir sofreram aquecimento rápido deixando-se por 30 segundos em banho-maria a 42°C. O tubo foi imediatamente colocado no gelo, e a ele adicionados 250µl do meio SOC com MgCl₂, em presença de lâmparina acesa, e incubado sob vigorosa agitação (200 rpm) a 37°C por 1 hora, de maneira que os tubos ficassem adequadamente fechados, horizontais e presos a suporte ideal por meio de gaze e fita crepe. Usando técnica estéril, 20 a 100µl da solução plasmídeo-bactéria foram transferidos para placas de agarose com ampicilina 75 µg/ml. Essas soluções foram colocadas na placa e espalhadas com alça de platina na presença de lâmparina acesa. A alça foi sempre levada ao rubro durante esse procedimento. As placas assim preparadas foram fechadas e colocadas de ponta cabeça na estufa e ficaram incubadas durante a noite a 37°C em média de 18 horas. Foram feitas quatro placas, cada uma contendo 40, 60, 80 e 100µl, respectivamente. Uma colônia bacteriana foi selecionada e removida de cada placa e transferida para diferentes tubos falcon de polietileno contendo 2ml de meio LB Broth e 2µl de ampicilina (75 µg/µl) que ficou sob vigorosa agitação durante 8 horas a 37°C, até turvar. Quatro colônias bacterianas foram coletadas e cultivadas em quatro diferentes tubos Falcon 5029, de onde foi coletada uma amostra para extração de DNA e feita a confirmação da presença do inserto por PCR utilizando-se iniciadores específicos.

A porção da amostra a ser seqüenciada foi manipulada da maneira a seguir: foram removidos 70µl das amostras turvas contidas no tubo Falcon, e separadamente adicionadas em tubos Eppendorf contendo 30µl de água estéril. Cada tubo foi

submetido à fervura em banho maria a 95°C por 10 minutos, submetido a centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos e 70µl do seu sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, utilizou-se 5µl desse volume para amplificação por PCR. As amostras foram então corridas em gel de agarose a 1% e a intensidade de suas bandas foi comparada com aquelas do padrão a fim de se obter uma estimativa da quantidade de cDNA presente nessas bandas, de acordo com instruções do fabricante, de maneira que a intensidade da banda do produto de PCR correspondesse a pelo menos 20 ng de cDNA. Após isso, foram feitas purificações desses produtos com a utilização de 2µl da enzima Exosap (kit Exosap®, Invitrogen) para cada 5µl do produto de PCR. Assim, foram adicionados 6µl da enzima Exosap em 15µl do produto de PCR e cada tubo contendo a mistura foi submetido à temperatura de 37°C por 1 hora, 80°C por 15 minutos e 4°C por 2 horas. Feito isso, 1µl do produto purificado foi corrido em gel de agarose, fotografado e o restante do seu produto finalmente enviado para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, juntamente com os iniciadores específicos para o gene PITX1.

4.6 Transformação do Plasmídio

Após o seqüenciamento, as bactérias foram colocadas para crescer a fim de dar prosseguimento às etapas que visavam a purificação do DNA plasmídio e a confecção das sondas. Dessa maneira, 500ml do meio LB Broth e 500µl de ampicilina (na concentração de 75µg/µl) foram colocados em um frasco e a ele adicionado o conteúdo

de um dos tubos turvos previamente preparados contendo as bactérias com o vetor e inserto seqüenciado. Esse frasco permaneceu na estufa a 37°C sob agitação por aproximadamente 18 horas, pouco rosqueado e em condições para que as bactérias crescessem adequadamente.

No dia seguinte, uma alíquota da suspensão bacteriana foi retirada, misturada com glicerol na concentração de 6:1 e congelada a -80°C, como reserva caso necessário. O restante foi transferido para frascos de 250ml e centrifugado a 6000 rpm durante 15 minutos, a 20°C e o corpo de fundo resultante submetido à extração e purificação de DNA através do sistema Wizard® Plus Maxipreps (Promega WI, USA). O corpo de fundo foi dissolvido com 15ml de solução de suspensão celular (Tris-HCl 50mM, pH 7.5; EDTA 10mM; RNase A 100µg/ml) e a este volume foi adicionado 15ml de solução de lise (NaOH 0.2M; SDS 1%), permanecendo sob agitação por aproximadamente 30 minutos. Quando a solução se tornou clara e viscosa foi acrescentado ao volume 15ml de solução neutralizadora e o total centrifugado a 9500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) em rotor J.A 14.0 da Centrífuga Beckman. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo de centrífuga de 50ml com o auxílio de gaze estéril, e foi adicionado a este ½ volume de isopropanol para em seguida ser centrifugado novamente a 9500 rpm durante 15 minutos à TA. O sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo obtido foi dissolvido com 2ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.5; EDTA 1mM) e então acrescido de 10ml de resina pré-aquecida a 30°C. A mistura DNA-resina foi então transferida para colunas, acondicionadas a um aparato de vácuo e submetidas a dois ciclos de lavagem com a seguinte solução: NaCl 85mM; Tris-HCl pH 7.5, 8.5mM e EDTA 2mM e intercaladas com a aplicação de vácuo. As colunas foram lavadas com álcool 80% e secadas a

vácuo por 5 minutos. Em seguida as colunas foram inseridas em tubos corning de 50ml e centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos em rotor JS7.5. Em seguida, foram transferidas para novos tubos e adicionou-se 500µl de tampão TE pré-aquecido e após 2 minutos foram submetidas a nova centrifugação de 2500 rpm por 5 minutos. O DNA plasmídeo eluído foi transferido para tubo eppendorf e estocado a 4°C. A concentração final do DNA foi obtida por densidade óptica em espectrofotômetro (Beckmam DU-640).

4.7 Preparo da sonda

O gene amplificado por PCR corresponde a um fragmento de 455 pb contido em um segmento de mRNA com 90% de homologia entre o gene de humanos (NM_0022653) e camundongos (NM_011097), conforme obtido por “pairwise” BLAST. Esse fragmento, após ser submetido a subclonagem e transformação no plasmídeo, como citado anteriormente, foi linearizado com enzimas de restrição (Figura 4.1) e transcrito, com uso de RNAs polimerases, em sondas senso e antisenso específicas para o gene a fim de serem utilizadas nas reações de hibridização *in situ*. A sonda antisenso para o PITX1 foi gerada com a RNA polimerase SP6, após ter sofrido linearização do seu plasmídeo com a endonuclease de restrição EcoR5 e a sonda senso foi transcrita com a polimerase T7, após digestão com a endonuclease de restrição BamH1.

A digestão do plasmídio contendo o inserto se deu na concentração deste de 5µl/µl na presença do tampão indicado (1X) para obtenção de 100% de atividade para a endonuclease utilizada e de 1 a 2 unidades da enzima, na temperatura ótima conforme instruções do fornecedor, em um total de solução preparada de 20µl, durante aproximadamente 6 horas a 37°C. Feito isso, 2µl do plasmídio digerido (DNA linearizado) com a enzima de restrição foi transcrito com 1µl da polimerase de RNA (0,5%), em um tubo eppendorf, na presença de tampão de transcrição (5X), DTT (Ditiotreitol) 1mM, nucleotídios (ATP, CTP, GTP 10mM, UTP 6,5mM e UTP-digoxigenina 3,5mM), inibidor de RNase (40 unidades), e água DEPC para completar 20µl de solução no tubo de cada sonda, durante 2 horas a 37°C. O restante do DNA linearizado foi armazenado a 4°C para futuras transcrições em sonda.

A inspeção da sonda transcrita em RNA foi efetuada por meio de gel de agarose a 1% em TAE contendo Brometo de Etídio (concentração de 5mg/ml). O resultado foi observado numa câmara de transluminescência e documentado em filme Polaroid.

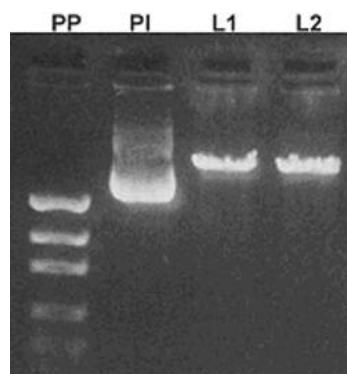


Figura 4.1 – Gel de agarose a 1% mostrando o DNA plasmídeo e o DNA linearizado. PP= padrão de pares de base; PI= DNA plasmídeo; L1= linearização com enzima EcoR5; L2= linearização com enzima BamH1

Após a inspeção, com a finalidade de precipitação do RNA, foi adicionado ao restante do volume do tubo 2µl de Dnase, e a mistura incubada a 37°C durante 15 minutos, após os que foram adicionados 10µl de cloreto de lítio 4M, 300µl de etanol 100% e 100µl de água DEPC. As sondas assim produzidas foram agitadas e mantidas a -20°C até o momento do uso.

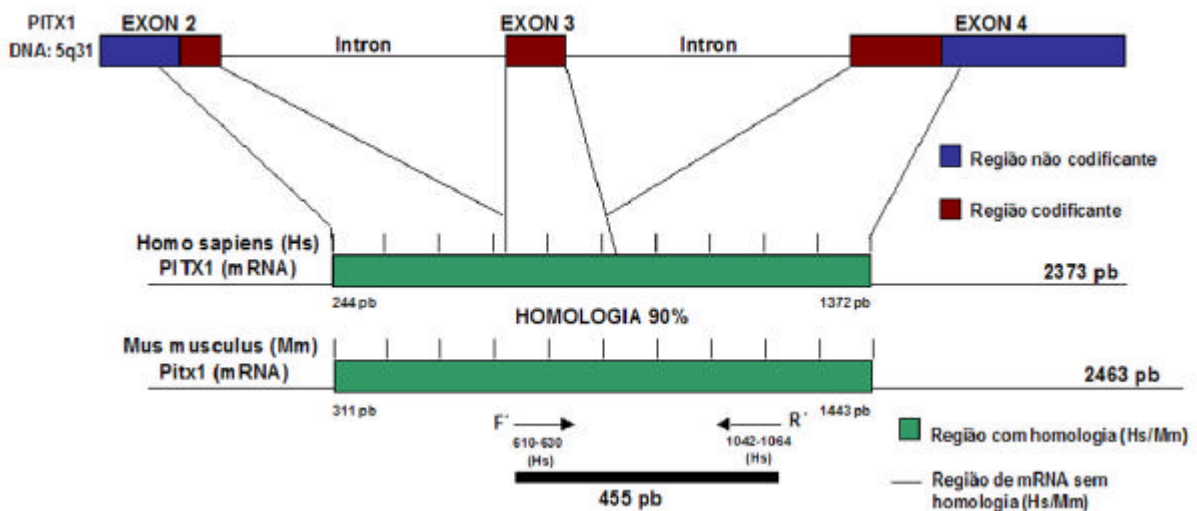


Figura 4.2 – Esquema mostrando a região codificante do gene PITX1 em humanos, bem como o fragmento da sonda de 455 pb contido no mRNA do gene. Observar homologia de 90% do transcrito entre humanos e camundongos

4.8 Hibridização *in situ* (ISH)

O método utilizado foi o descrito previamente por Wu e Oh (1996) com algumas modificações. As lâminas contendo cortes dos tumores e tecidos não tumorais adjacentes foram descongeladas e deixadas para secar por aproximadamente três horas, antes de serem submetidas à solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0.2% em PBS durante 20 minutos à TA. A seguir, eram transferidas para recipientes (TissueTek, VWR) onde ficavam imersas numa seqüência de 6% H₂O₂, proteinase K 10µg/ml (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), glicina 2 mg/ml, e paraformaldeído 4% com glutaraldeído 2%. Essas soluções foram preparadas em PBS/0.1% Tween 20 (PBT), e cada incubação foi alternada com lavagens no tampão de PBT.

As lâminas assim processadas foram pré hibridizadas em grupo de 4 num saco plástico selado pelo calor, e imersas na solução de hibridização onde ficavam durante 1 hora a 50°C no forno de hibridização. A solução de hibridização consiste em formamida 50%, 5X SSC (pH 4.5), heparina 50 µg/ml, RNA de levedura 50 µg/ml, 1% SDS e água para completar 50 ml, pré aquecida a 50°C.

Antes de ser adicionada à solução de hibridização, a sonda de RNA foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 14.000 rpm, lavada com 500µl de etanol 70% e centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm. O corpo de fundo foi secado a vácuo por aproximadamente 2 minutos e então dissolvido com 40 µl de água DEPC de onde foram retirados 10 µl para adição em cada saco plástico contendo as lâminas em solução de hibridização. As lâminas ficavam incubadas nessa solução durante toda a noite, no forno de hibridização a 50°C.

No dia seguinte as lâminas foram removidas dos sacos plásticos, e lavadas numa solução estrigente a 50°C, com 3 trocas de 10 minutos, num banho-maria sob agitação. Essa solução consistiu de formamida a 50%, 20X SSC (pH 4.5) à 30%, 10X SDS à 10% e 10% de água, pré aquecida a 70°C. O mesmo procedimento foi repetido para uma solução de formamida à 50%, 20X SSC (pH 4.5) à 12%, e 38% de água, abaixando-se a temperatura para 45°C com 3 trocas de 10 minutos.

As lâminas, então foram lavadas com uma solução contendo 10% de TBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, 25% de 1M Tris pH 7.5 e 75% de água), 0.1% de Tween 20, 0.04% de levamisole e 80% de água (TBST). Em seguida foram bloqueadas com soro fetal bovino à 10% nessa mesma solução durante 1 hora à TA. Após o bloqueio, as lâminas foram novamente colocadas em grupo de 4 numa solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina, em um saco plástico selado pelo calor, onde ficaram durante 18 horas a 4°C sob agitação. Essa solução continha soro fetal bovino à 1:300 e anticorpo anti-digoxigenina à 1:2000.

Terminada a incubação com o anticorpo, as lâminas foram lavadas extensivamente com TBST e então incubadas em NTMT (NaCl 5M à 2%, 2M Tris-HCl pH 9.5, MgCl₂ 2M à 2.5%, Tween 20 à 1% em água). A detecção da reação deu-se no escuro, com NBT (0,075 g/1ml em dimetilformamida 70%) e BCIP (0,05g/1ml em água) misturados com NTMT na concentração de 1:300 e 1:380 respectivamente, durante o tempo necessário para visualização do sinal. A reação de revelação foi bloqueada com PBT e EDTA (0.5M) na proporção de 1:500. O resultado da reação foi analisado e documentado fotograficamente em um microscópio Zeiss, Jenapol.

5 RESULTADOS

O transcrito do gene PITX1 foi amplificado em 86,2% (n=25) dos pacientes. Desse total, 28% (n=7) foram amplificados somente nos tumores, 16% (n=4) somente nos tecidos não tumorais e 56% (n=14) em ambos os tecidos. De forma geral, o transcrito foi amplificado em 84% dos tumores e em 72% dos tecidos não tumorais adjacentes. A figura 5.2 mostra alguns casos de amplificação dos transcritos do gene PITX1 em gel de agarose a 1%. A seqüência do amplicon foi confirmada após clonagem e seqüenciamento como pode ser observado pelo cromatograma apresentado na figura 5.1. Foi realizada análise estatística através do Z-test (teste de diferença de proporção entre duas populações) e o resultado demonstrou que houve diferença estatística entre os casos amplificados e os não amplificados, bem como entre os casos amplificados em tecidos não tumorais isoladamente e aqueles amplificados em ambos os tecidos (não tumorais e tumorais), porém não houve diferença significativa entre a amplificação e o tipo de tecido analisado (Anexo C).

As reações de hibridização *in situ* foram realizadas nos casos amplificados por RT-PCR, para fins de análise qualitativa do padrão de expressão do gene em estudo. Além disso reações de hibridização *in situ* também foram realizadas nesses tecidos com o gene constitutivo da β -actina e confirmaram a adequada preservação e reatividade dos tecidos utilizados nas reações. Os casos que não puderam ser aproveitados foram devidos a limitações técnicas como dificuldade de amplificação para o gene constitutivo da β -actina e falta de material disponível. As sondas de mRNA antisense utilizadas mostraram marcação específica para o tecido epitelial em todas as reações e as sondas

senso resultaram na ausência de sinal. A marcação do tecido não tumoral adjacente à lesão mostrou três padrões básicos: presença de transcritos bem evidentes por toda extensão do epitélio de maneira quase homogênea (Figura 5.3 – B); presença dos transcritos restrita a camada basal do epitélio de revestimento ora mais discreta ora mais evidente (Figura 5.3 – C, D); distribuição de transcritos em algumas células do epitélio em intensidades variadas sem nítida diferenciação das populações celulares especificamente marcadas (Figura 5.3 – E). Foram observados transcritos em maior quantidade no tecido epitelial não tumoral adjacente e sinal mais discreto no epitélio neoplásico (Figura 5. 4 – B), porém houve também marcação mais evidente em regiões pontuais do tecido neoplásico (Figura 5. 4 – C, F1). Na profundidade das lesões, houve marcação somente em algumas populações celulares ora discretas ora mais evidentes, sem que se identificasse com precisão que tipo de população estava marcada (Figura 5.4 – D, F1). Nos casos em que encontramos pérolas de queratina, houve marcação nas células ao redor dessas pérolas (Figura 5.4).

Em relação ao perfil dos pacientes, a maioria deles estava representada por homens (65,3%), brancos (91,6%). fumantes (65,2%), etilistas (54,5%), situados entre a 2^a e 8^a décadas de vida e com uma média de 55 anos de idade. As lesões estavam localizadas preferencialmente na língua (65,4%), seguidas da região de soalho bucal (11,54%) e lábio inferior (7,7%). As outras localizações envolviam maxila, mento, trígono retromolar e rebordo alveolar inferior (Anexo B).

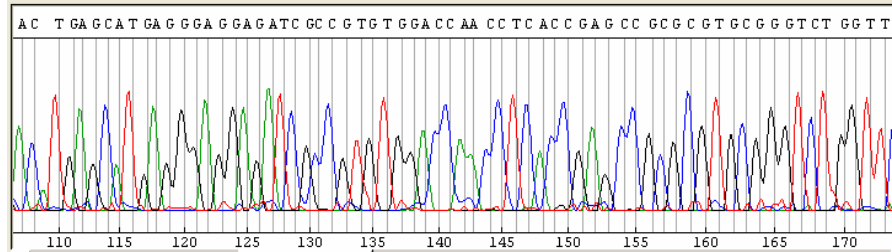


Figura 5.1 – Cromatograma contendo parte do transcrito do gene PITX1 enviado para seqüenciamento

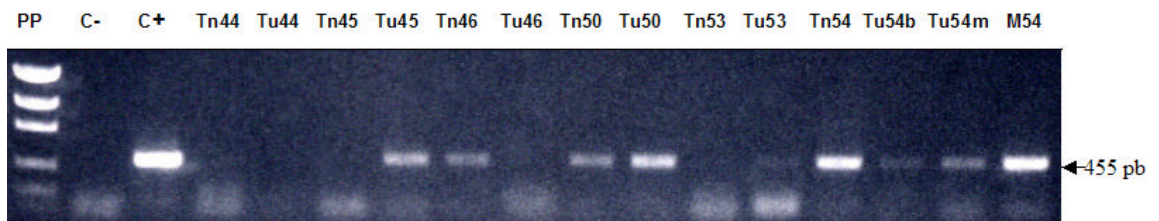


Figura 5.2 – Gel de agarose a 1% mostrando amplificação nos casos 45, 46, 50, 53 e 54. C-= controle negativo; C+= controle positivo; Tn= tecido não tumoral adjacente; Tu= tumor; M= metastase; PP= padrão de pares de bases; pb= pares de bases.

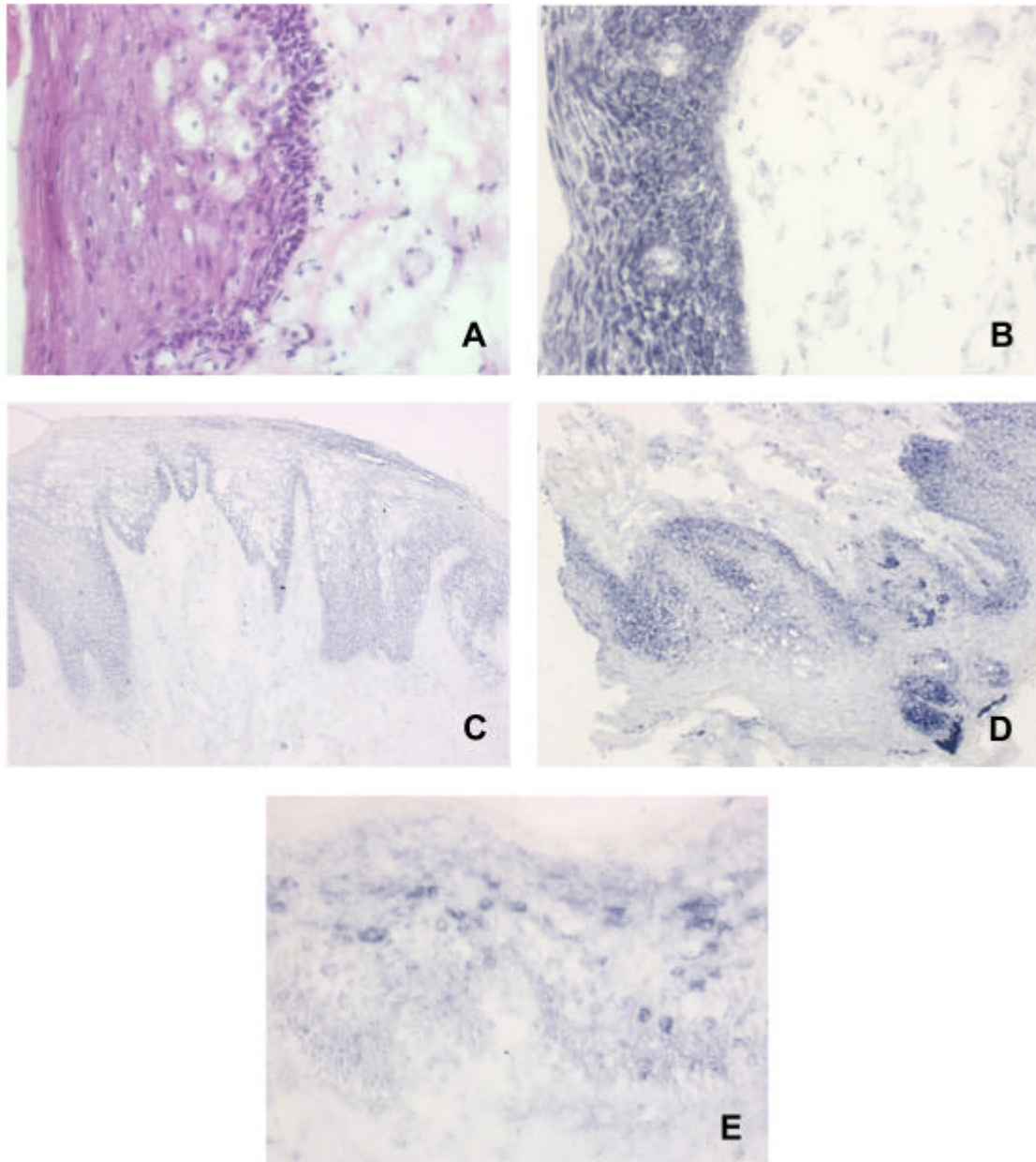


Figura 5.3 – Localização de transcritos do PITX1 em tecidos não tumorais adjacentes ao tumor. (A) HE de tecido não tumoral. (B) hibridização in situ com sonda antisense, mostrando presença evidente de transcritos em toda extensão do epitélio não tumoral. (C) expressão mais branda de transcritos restrita a camada basal do epitélio de revestimento. (D) expressão mais intensa de transcritos restrita a camada basal do epitélio de revestimento. (E) corte mostrando diferença na distribuição de transcritos em várias camadas do epitélio de revestimento

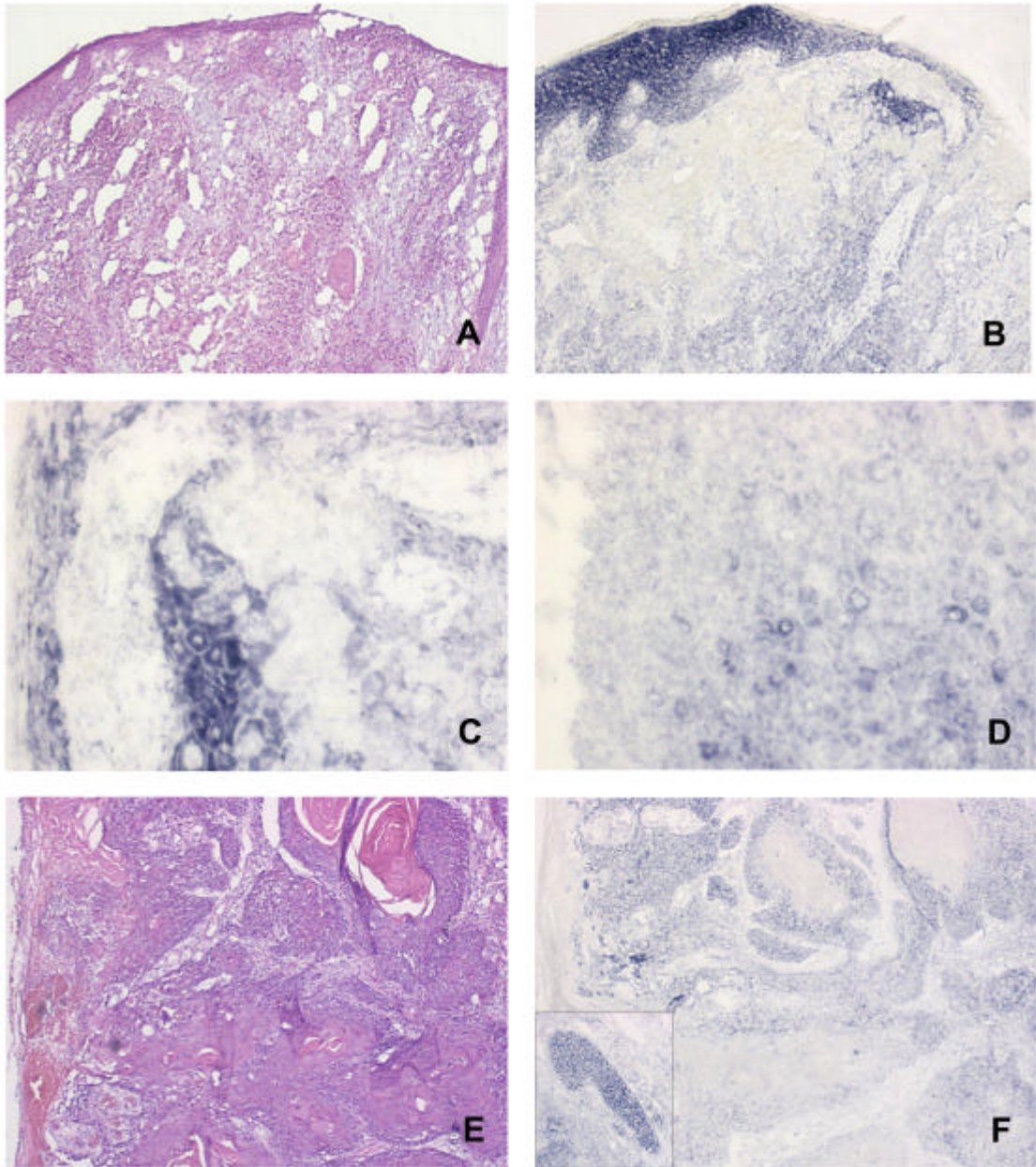


Figura 5.4 – Localização de transcritos do PITX1 nos tumores. (A) HE de tecido tumoral. (B) hibridização in situ do tumor com sonda antisense, mostrando transcritos em maior quantidade no epitélio não tumoral e sinal mais discreto no epitélio neoplásico. (C) detalhe da figura anterior, evidenciando uma ilhota epitelial bem marcada no interior da neoplasia. (D) marcação mais evidente em algumas populações celulares da neoplasia, próxima ao epitélio de revestimento. (E) HE de tecido não tumoral, mostrando ilhotas epiteliais e pérolas de queratina. (F) marcação em células epiteliais ao redor das pérolas de queratina. Notar fragmento mais intenso na profundidade do mesmo caso

6 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho procuramos estudar a presença de transcritos do gene PITX1 em carcinomas epidermóides de boca. Essa hipótese teve por base transcritos desse gene terem sido encontrados durante o Projeto “Genoma Câncer de Cabeça e Pescoço”. Esse projeto envolveu a análise genômica detalhada de transcritos derivados de tecidos tumorais e não tumorais da boca, laringe, faringe e tireóide, porém não sabíamos se esses transcritos estavam presentes nos tecidos retirados da boca. Nossos resultados mostraram amplificação de transcritos desse gene em 86,2% dos pacientes. De maneira geral, houve amplificação em 84% dos carcinomas epidermóides avaliados e em 72% dos tecidos não tumorais adjacentes a essas lesões. De maneira mais detalhada, observamos que 28% dos casos foram amplificados somente nos tumores, 16% somente nos tecidos não tumorais e 56% em ambos os tecidos. A análise estatística demonstrou que há maior tendência para haver amplificação nas amostras coletadas, de maneira que são maiores as chances de amplificação em ambos os tecidos (não tumorais e tumorais) quando comparadas com as amplificações de tecidos não tumorais isoladamente. Porém, não houve uma diferença significativa entre a amplificação e o tipo de tecido analisado. Esse fato pode significar que o gene tenha alguma função tanto no tumor quanto na porção não tumoral adjacente. No entanto deve-se considerar que a amplificação de transcritos desse gene no tecido não tumoral adjacente ao tumor pode ser devida a alterações genéticas presentes nesses tecidos, que apenas apresentavam, morfológicamente, características usuais de normalidade.

A RT-PCR como técnica é extremamente sensível, porém não permite estudar a população celular ou o tipo de tecido que está apresentando transcritos para o gene em estudo. Com essa finalidade a técnica de hibridização *in situ* se enquadra perfeitamente nesse aspecto, e por isso foi realizada nesse trabalho, permitindo-nos verificar se os transcritos do gene PTX1 estavam localizados no componente epitelial ou mesenquimal de nossas amostras. Nossos resultados mostraram que os transcritos estavam predominantemente presentes na porção epitelial em todos os casos, porém distribuindo-se de forma heterogênea nas populações celulares, tanto dos tumores quanto dos tecidos não tumorais adjacentes. Considerando-se o componente epitelial tumoral comparado com o tecido epitelial não tumoral adjacente nos mesmos cortes, observamos sinal mais discreto em áreas mais extensas da neoplasia, o que sustentaria a possível hipótese de que uma vez participando da fisiologia normal de células mais maduras, o gene se tornaria de baixa expressão em células neoplásicas (ABATE-SHEN, 2002). Embora, como consideramos acima, em sendo epitélio adjacente a neoplasia a possibilidade de haver alterações moleculares não pode ser excluída. Em adição a hipótese dos transcritos estarem presentes em células mais maduras, nas áreas que encontramos pérolas de queratina, observamos marcação um pouco mais nítida nas células ao redor dessas pérolas, ou seja, provavelmente em populações celulares mais próximas do estágio de diferenciação final. Em contrapartida, em alguns casos, encontramos também marcação forte em regiões pontuais do tecido neoplásico, misturadas a regiões de sinal discreto, além de outras regiões com intensidades variadas de marcação sem que fosse possível identificar com exatidão o tipo de população celular marcada, dificultando qualquer interpretação mais decisiva a respeito do padrão de marcação relacionada com a diferenciação celular,

nos casos analisados como um todo. Já em relação ao tecido não tumoral adjacente à lesão, a forte marcação ao longo de todo o epitélio de revestimento de alguns casos nos faria supor que o gene poderia participar da fisiologia normal dessas células, assim como o faz para as células pituitárias anteriores maduras (KUROTANI et al., 1999; LAMONERIE et al., 1996; SKELLY et al., 2000; TREMBLAY; DROUIN, 1999; ZAKARIA et al., 2002), porém a marcação em alguns casos restrita a camada basal do epitélio e outras marcações observadas em dispersas populações celulares ao longo do epitélio de revestimento suprabasal poderia ao mesmo tempo sugerir mudança de expressão desse gene em populações celulares distintas com características peculiares não bem definidas. Adicionalmente, em alguns de nossos casos observamos marcação de epitélio de glândula salivar, endotélio vascular e células inflamatórias. No caso da presença de transcritos em glândula salivar seria interessante a realização de estudos envolvendo a análise da expressão desses transcritos em neoplasias de glândula salivar.

Uma possibilidade para a presença de transcritos no epitélio adjacente à neoplasia ou no epitélio não tumoral, conforme afirmamos anteriormente, seria a presença de alterações moleculares presentes no epitélio morfológicamente normal. Deve ser considerado que o epitélio morfológicamente normal que utilizamos veio do mesmo paciente portador do carcinoma epidermóide, embora estivesse distante da neoplasia. Para sabermos se os transcritos estariam presentes nesse epitélio em decorrência dessas alterações moleculares, seria necessário verificar essa expressão em epitélio normal de pacientes não portadores de neoplasia, e também em lesões cancerizáveis com diferentes graus de atipia. Após esses estudos talvez pudéssemos entender melhor a marcação heterogênea de transcritos do gene PITX1, observada nas regiões

tumorais e não tumorais adjacentes. Considerando-se a possibilidade de que esse gene atuaria na fisiologia normal da célula, poderíamos pensar em duas possibilidades em relação a esse aspecto: células que estariam em transição para a neoplasia poderiam demonstrar ganho de expressão do gene e no momento da transformação neoplásica, apresentariam perda de expressão ou então, no momento dessa transição, o gene iria progressivamente perdendo sua expressão no decorrer da transformação neoplásica. Reforçando essa hipótese seria a possibilidade de que a marcação nítida observada em populações tumorais presentes em regiões pontuais do tecido neoplásico poderia corresponder a regiões celulares mais diferenciadas ao longo de todo o tecido neoplásico, já que pudemos observar também marcação mais nítida ao redor das pérolas de queratina, ou seja, provavelmente células mais próximas do estágio de maturidade final. Porém as células que apresentavam transcritos de forma mais intensa no interior da neoplasia não se apresentavam morfologicamente distintas de outras células que não apresentavam esses transcritos.

Correlações com os aspectos clínicos poderiam ajudar também a definir características do estágio de progressão da doença e o padrão de expressão do gene nessas situações, o que permitiria avaliar com mais precisão sua participação na iniciação e/ou progressão da doença com vistas à busca de marcadores neoplásicos que ajudariam no processo diagnóstico e prognóstico. Em função do pequeno tempo de seguimento dos pacientes avaliados nesse estudo, essa correlação não foi realizada. Porém analisando o perfil desses pacientes observamos que a maioria estava representada por homens, brancos, fumantes, etilistas, situados entre a 2^a e 8^a décadas de vida e com uma média de 55 anos de idade. As lesões estavam localizadas preferencialmente na língua, seguidas da região de soalho bucal e lábio inferior. As

outras localizações envolviam maxila, mento, trígono retromolar e rebordo alveolar inferior. Esses achados estão em concordância com os relatados pela literatura para o carcinoma epidermóide de boca (BRANDÃO; CAVALHEIRO; SONDERMANN, 2000; NEVILLE et al., 1998).

Infelizmente a maioria dos estudos que correlacionaram achados moleculares com aspectos clínicos em tumores de partes moles utilizaram um ou dois marcadores moleculares somente. No entanto, uma análise genotípica mais aprofundada é claramente necessária para explorar completamente a relação entre variáveis clínicas e a genética molecular do tumor (MELTZER, 1995). Nesse sentido é importante considerar que esse estudo é parte de um projeto maior, onde transcritos de vários outros genes estão sendo estudados.

Por compartilharem mecanismos comuns no processo de proliferação e diferenciação, genes de desenvolvimento estão sendo progressivamente associados com neoplasias malignas (GAILANI; BALE, 1997; ANBAZHAGAN; RAMAN, 1997; BONCINELLI, 1997; CILLO et al., 1999; FORD, 1998; LAWRENCE et al., 1996; MARK; RIJLI; CHAMBOM, 1997; NUNES et al., 2003). O enfoque central desse trabalho foi dado aos genes da família homeobox que são essenciais para o controle do desenvolvimento e evolução. Sabe-se que genes homeobox têm mostrado padrões de expressão órgão-específicos, que persistem durante a transformação neoplásica. Essa propriedade sugere que a análise da sua expressão em neoplasias pode ser extremamente útil para o diagnóstico e avaliação da lesão primária, além de servir como sonda para a detecção de metástases de origens desconhecidas (CHEN; SUKUMAR, 2003; TAKAHASHI et al., 2004). Redline et al. (1994), mostraram que tumores malignos apresentavam desregulação de genes HOX importantes na sua

histogênese, servindo de indicador confiável do subtipo histológico em uma variedade de tumores e em alguns casos representavam ferramentas diagnósticas muito úteis.

Diversos trabalhos têm relacionado também o grau de diferenciação com a expressão de genes homeobox. Nesse aspecto, Rieger et al. (1994) observaram expressão predominante do gene HOXC4 em queratinócitos diferenciados, ao passo que em células mais indiferenciadas (neoplásicas), o gene mostrava-se com baixa expressão. Já Chang et al. (1998) demonstraram que a maioria dos membros do grupo Hox estava expressa na pele normal de camundongos, enquanto seu repertório era substancialmente limitado em papilomas e carcinomas, com silenciamento completo de todo o grupo HOXD. Outros trabalhos também demonstram que o ganho de expressão de genes homeobox pode contribuir para processo neoplásico. Dessa maneira, Caré et al. (1996), demonstraram que o gene HOXB7 estava expresso em maior quantidade e ativando constitutivamente o fator de crescimento fibroblástico básico em melanomas.

Apesar de muitos estudos relatarem a expressão desregulada e diferencial de genes homeobox em uma gama de neoplasias, poucos deles estabeleceram papéis funcionais desses genes na carcinogênese. Com relação ao gene PITX1, sua expressão na parte anterior do embrião e no mesoderma da placa lateral posterior já está bem estabelecida, demonstrando ter papel tanto na proliferação quanto diferenciação já que, além de atuar na embriogênese dessas estruturas, também participa da fisiologia normal da glândula pituitária anterior (GOODYER et al., 2003; LANCTÔT; GAUTHIER; DROUIN, 1999; LANCTÔT; LAMOLET; DROUIN, 1997; LANCTÔT et al., 1999; SHANG; LUO; CLAYTON, 1997), porém falta definir com mais exatidão sua definitiva participação não somente na embriogênese e/ou diferenciação dessas como também de outras estruturas, a fim de se esclarecer os mecanismos

regulatórios que atuam na sua expressão e como a sua desregulação pode interferir em processos fisiológicos importantes que podem levar ao câncer. De maneira geral, existe uma dificuldade em se definir as vias de sinalização localizadas a montante e a jusante dos genes homeobox. Essa dificuldade é parcialmente devida a simplicidade de motivos de ligação do núcleo (ATTA), presentes em muitos promotores genéticos alvo, o que pode potencialmente oferecer áreas de ligação para muitas proteínas que possuem homeodomínio. Além disso, para um melhor entendimento sobre o papel de genes homeobox na carcinogênese, é necessário esclarecer de que maneira ocorre cooperação entre esses genes na regulação da proliferação e diferenciação celular, se suas proteínas atuam somente como fatores de transcrição e se o seu homeodomínio é necessário para todas as suas funções (CHEN; SUKUMAR, 2003). Não encontramos nenhum trabalho na literatura que demonstrasse a efetiva participação do gene PITX1 em carcinomas epidermóides. No entanto, apenas um estudo de microarray utilizando cDNAs oriundos de câncer de boca identificou vários genes expressos nesse tipo de lesão, dentre eles o gene PITX1 que se apresentava com baixa expressão (MORIYA et al. 2003). Esse achado vem ao encontro do fato de que transcritos desse gene foram encontrados pelo Projeto Genoma Câncer. O pouco que se sabe no momento, relaciona sua expressão principalmente a neoplasias benignas da pituitária anterior humana.

Interessante notar que genes comuns também podem estar desregulados em diferentes neoplasias, cujo exato papel pode variar de câncer para câncer, não havendo condições de estabelecer, na realidade se sua ação é como causa ou consequência nessas situações (ABATE-SHEN, 2002, ABATE-SHEN, 2003; CARÉ et al., 1996). De maneira geral, a maioria dos cânceres que apresentam expressão desregulada de

genes homeobox seguem uma simples regra: genes normalmente expressos durante a embriogênese apresentam ganho de expressão no câncer, enquanto aqueles que estão normalmente expressos durante a diferenciação ou em tecidos diferenciados, estão com baixa expressão nessas lesões, isso significa que, geralmente, as conseqüências dos genes homeobox para o processo de carcinogênese podem ser interpretadas como uma extensão de sua função normal (ABATE-SHEN, 2002).

Tudo leva a crer que a explosão de informações a respeito da genética do câncer irá causar um refinamento diagnóstico, revelando marcadores prognósticos importantes e, por conseqüência a identificação de novos alvos terapêuticos. No caso do carcinoma epidermóide de boca, a análise da expressão diferencial dos genes homeobox nesse tipo de neoplasia deve ser feita de maneira integrada com os outros membros dessa família. Nesse trabalho levantamos a possibilidade de que o gene PITX1 pode estar envolvido com a carcinogênese de boca, já que o transcrito do gene foi encontrado nesse tipo de lesão utilizando-se RT-PCR e hibridização *in situ*.

7 CONCLUSÕES

7.1 Os resultados obtidos sugerem que o gene PITX1 pode estar envolvido com a carcinogênese de boca.

7.2 A verificação heterogênea de transcritos do gene PITX1 em tecidos tumorais e não tumorais adjacentes sugere que o gene pode ter alguma função não somente na carcinogênese como também na fisiologia de populações celulares morfológicamente normais.

7.3 A marcação mais branda de transcritos do gene PITX1 em porções mais extensas do epitélio neoplásico analisado sugere que o gene tem uma tendência a perda de expressão em carcinomas epidermóides de boca.

REFERÊNCIAS¹

- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature* 2002;2:777-85.
- Abate-Shen C. Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune. *Cancer Cell* 2003;4:329-30.
- Akam M. Hox genes: from mater genes to micromanagers. *Curr Biol* 1998;8:676-8.
- Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu YP, Nguyen L, et al. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol* 2000;217:323-32.
- American Cancer Society. American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 5th ed. Chicago: Lippincott- Ravan;1997.
- Anbazhagan R, Raman V. Homeobox genes: molecular link between congenital anomalies and cancer. *Eur J Cancer* 1997;33(4):635-7.
- Beder LB, Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Gunduz E, Ito S, et al. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. *Lab Invest* 2003;83(1):99-105.
- Birman EG, Sugaya NN. Diagnóstico diferencial. In: Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 11, p.80-6.
- BLAST. Camundongos: NM_011097. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html> [2004 jun. 20].
- BLAST. Humanos: NM_0022653. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html> [2004 jun. 20].

¹ De acordo com estilo Vancouver. A abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Boncinelli E. Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:331-7.

Boncinelli E, Gulisano M, Broccoli V. Emx and Otx homeobox genes in the developing mouse brain. *J Neurobiol* 1993;24(10):1356-66.

Brandão LG, Cavalheiro BG, Sondermann A. Apresentação clínica e estadiamento. In: Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 10, p.71-9.

Brasil. Ministério da saúde. Instituto nacional do câncer - INCA. Falando sobre o câncer de boca. 2002. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/falandosobrecancerdeboca.pdf> [2004 jul. 6].

Brasileiro Filho G, Guimarães RC, Bogliolo L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia Geral. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. cap. 8, p. 149-192.

Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4842-51.

Cernea CR, Hojaj FC. Fatores prognósticos. In: Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 14, p.101-14.

Chang PY, Kozono T, Chida K, Kuroki T, Huh N. Differential expression of Hox genes in multistage carcinogenesis of mouse skin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:749-52.

Chen H, Sukumar S. Expression of pituitary homeobox 1 (Ptx1) in human non-neoplastic pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2000;13(10):1097-108.

Chen H, Sukumar S. Hox genes: emerging stars in cancer. *Cancer Biol Therapy* 2003;2(4):524-5.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 2001;188:161-9.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res* 1999;248:1-9.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 8, p. 233-295.

Crawford MJ, Lanctôt C, Tremblay JJ, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, et al. Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mammalian Genome* 1997;(8):841-5.

Das N, Majumder ND, DasGupta UB. *Ras* gene mutations in oral cancer in eastern Índia. *Oral Oncol* 2000;36:76-80.

Dash A, Gilliland D. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematology* 2001;14(1):49-64.

De Robertis EM, Oliver G, Wright CVE. Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Scient Am* 1990;263(1):46-52.

Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, et al. Pax genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 2002;46:535-44.

Edelman GM, Jones FS. Outside and downstream of the homeobox. *J Biol Chem* 1993;268(28):20683-6.

Epstein J, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas R. Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 1994;269(11):8355-61.

Ford HL. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and câncer? *Cell Biol int* 1998;22(6):397-400.

Gailani MR, Bale AE. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(15):1103-9.

Gehring WJ. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New York: Vail-Ballou Press, 1998. Chap 2-3, p.21-53.

Gilbert SF. Developmental biology. 6th ed. Sinauer; 2000. part 2. Chap.9. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=genes+homeoticos+AND+dbio%5Bbook%5D+AND+131567%5Buid%5D&rid=dbio.section.1971#2009> [2004 out. 8].

Goodman FR. Limb malformations and the human HOX genes. Am J Med Genet 2002;112:256-65.

Goodyer CG, Tremblay JJ, Paradis FW, Marcil A, Lanctôt C, Gauthier Y, et al. Pitx1 in vivo promoter activity and mechanisms of positive autoregulation. Neuroendocrinol 2003;673:1-9.

Guazzi S, Pintonello ML, Viganò A, Boncinelli E. Regulatory interactions between the human HOXB1, HOXB2, and HOXB3 proteins and the upstream sequence of the Otx2 gene in embryonal carcinoma cells. J Biol Chem 1998;273(18):11092-9.

Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. J Biol Chem 1994;269(22):15399-402.

Hyndman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousset S, Rozenblum E, et al. Impact of DNA amplification on gene patterns in breast cancer. Cancer Res 2002;62:6240-5.

Interactive Fly, *Drosophila: bicoid* - evolutionary homologs. Disponível em: URL: <http://sdb.bio.purdue.edu/fly/segment/bicoid2.htm> [2004 jul. 6].

INCA – Instituto Nacional do Câncer: câncer de boca. Disponível em: URL: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324 [2004 jul.6]

INCA – Instituto Nacional do Câncer: estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2003. Disponível em: URL: http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=4 [2004 jul.6]

Kelley CG, Lavorgna G, Clark ME, Boncielli E, Mellon PL. The Otx2 homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter. *Mol Endocrinol* 2000;14(8):1246-56.

Kowalski LP, Nishimoto IN. Epidemiologia do câncer de boca. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 1, p.3-11.

Kurotani R, Tahara S, Sanno N, Teramoto A, Mellon PL, Inoue K, et al. Expression of Ptx1 in the adult rat pituitary glands and pituitary cell lines: hormone-secreting cells and folliculo-stellate cells. *Cell Tissue Res* 1999;298:55-61.

Lamolet B, Pulichino A, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, et al. A pituitary cell-restricted T Box factor, Tpit activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 2001;104:849-59.

Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 1996;10(10):1284-95.

Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J. The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 1997;124:2807-17.

Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 1999;140(3):1416-22.

Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 1999;126:1805-10.

Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 1996;14:281-91.

Lebel M, Gauthier Y, Moreau A, Drouin J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *J Neurochem* 2001;(77):558-67.

Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan J, Bradley A, et al. Wnt5A inhibits cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 2003;4:349-60.

Logan M, Tabin CJ. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* 1999;283:1736-39.

Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and cranio facial development. *Nature* 1999;401:276-8.

Magalhães RP, Magalhães MHCG. Carcinógenos bucais. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 3, p.16-22.

Marcil A, Dumontier É, Chamberland M, Camper AS, Drouin J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development* 2003;130:45-55.

Mark M, Rijli F M, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42(4):559-68.

Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J* 1993;12:2361-67.

Meltzer PS. Molecular biology of soft tissue tumors. In: Enzinger FM, Weiss SW. *Soft tissue tumors*. 3rd ed. USA: Mosby: 1995. Chap. 4, p. 89-104.

Mitteldorf CATS. Anatomia patológica no câncer de boca. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 13, p.96-100.

Moriya T, Seki N, Shimada K, Kato M, Yakushiji T, Nimura Y, et al. In-house cDNA microarray analysis of gene expression profiles involved in SCC cell lines. *Int J Mol Med* 2003;12:429-35.

Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I. NUP98 is fused to PMX1 homeobox in human acute myelogenous leukemia with chromosome translocation t(1;11)(q23;p15). *Blood* 1999;94(2):741-7.

NCBI. Nucleotide NM_002653. Disponível em: URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=24234701>
[2004 jul. 6].

NCBI. Protein NP_002644. Disponível em: URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=24234702>
[2004 jul. 6].

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral & maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. cap. 10, p.287-96.

Nunes FD, Almeida FCS, Tucci, R, Sousa SCOM. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):94-8.

OMIM – Online mendelian inheritance in man: PITX1, n.602149. Disponível em: URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=OMIM&dopt=Detailed>.
[2004 jul. 6].

Pellegrini-Bouiller I, Manrique C, Gunz G, Grino M, Zamora AJ, Figarella-Branger D, et al. Expression of the members of the Ptx family of transcription factors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(6):2212-20.

Peralta RC, Casson AG, Wang RN, Keshavjee S, Redston M, Bapat B. Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer. *Int J Cancer* 1998;78(5):600-5.

Qiu M, Anderson S, Chen S, Meneses JJ, Hevner R, Kuwene E, et al. Mutation of the Emx-1 homeobox gene disrupts the corpus callosum. *Develop Biol* 1996;178:174-8.

Redline RW, Hudock P, MacFee M, Patterson P. Expression of AbdB-type homeobox genes in human tumors. *Lab Invest* 1994;71(5):663-70.

Rieger E, Bijl JJ, van Oostveen JW, Soyer HP, Oudejans CBM, Jiwa NM, et al. Expression of the homeobox gene HOXC4 in keratinocytes of normal skin and epithelial skin tumors is correlated with differentiation. *J Invest Dermatol* 1994;103(3):341-6.

Sabbaga J. Oncogenes e antioncogenes. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 4, p.23-28.

Schully C, Field FK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. Oral Oncol 2000; 36:311-27.

Semina EV, Reiter RS, Murray JC. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the *aphakia* region on mouse chromosome 19. Hum Mol Genet 1997;6(12):2109-16.

Shang J, Li X, Ring HZ, Clayton DA, Francke U. Backfoot, a novel homeobox gene, maps to human chromosome 5 (BFT) and mouse chromosome 13 (Bft). Genomics 1997;(40):108-13.

Shang J, Luo Y, Clayton D. Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. Develop Dynamics 1997;209:242-53.

Skelly RH, Korbonits M, Grossman A, Besser GM, Monson JP, Geddes JF, et al. Expression of the pituitary transcription factor Ptx-1, but not that of the trans-activating factor Prop-1, is reduced in human corticotroph adenomas and is associated with decreased α -Subunit secretion. J Clin Endocrinol Metab 2000;85(7):2537-41.

Squarize CH, Castilho RM, Pinto Jr. DS. Immunohistochemical evidence of *PTEN* in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. J Oral Pathol Med 2002;31:1-6.

Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. Genes Dev 1999;(13):484-94.

Tahara S, Kurotani R, Sanno N, Takumi I, Yoshimura S, Osamura RY, et al. Expression of pituitary homeobox 1 (Ptx1) in human non-neoplastic pituitaries and pituitary adenomas. Mod Pathol 2000;13(10):1097-108.

Takahashi C, Akiyama N, Kitawama H, Takai S, Noda M. Possible involvement of Msx-2 homeoprotein in v-ras-induced transformation. Leukemia 1997;Suppl 3:340-43.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa, Takada M, Tada M, Nogami I, et al., Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Exp Cell Res* 2004; 293:144-53.

Thomas BL, Liu JK, Rubenstein JLK, Sharpe PT. Independent regulation of Dlx2 expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch. *Development* 2000;127:217-24.

Tremblay JJ, Lanctôt C, Drouin J. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (Pituitary Homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* 1998;12(3):428-41.

Tremblay JJ, Drouin J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol Cell Biol* 1999;19(4):2567-76.

Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* 1999;18(12):3431-41.

Troubleshooting for PCR and multiplex PCR. Disponível em: URL: <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html> [2003 set. 5].

UICC. Union Internationale Contra le Cancer. Atlas TNM: Guia ilustrado para classificação TNM/pTNM de tumores malignos. São Paulo: Fundação Oncocentro; 1992.

van Es J, Barker N, Clevers H. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:28-33.

Wawersik S, Maas RL. Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Human Mol Genet* 2000;9(6):917-25.

Wu D, Oh SH. Sensory organ generation in the chick inner ear. *J Neurosci* 1996;16:6454-62.

Wuyts W, Reardon W, Preis S, Homfrey T, Rasore-Quartino A, Christian H, et al. Identification of mutations in the MSX2 homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. *Human Gnet* 2000;9(8):1251-5.

Yuen APW, Lam KY, Wei WI, Lam KY, Ho CM, Chow TL, et al. A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *Am J Surg* 2000;180:139-43.

Zakaria MM, Jeong K, Lacza C, Kaiser UB. Pituitary homeobox 1 activates the rat FSH β (rFSH β) gene through both direct and indirect interactions with the rFSH β gene promoter. *Mol Endocrinol* 2002;16(8):1840-52.

ANEXO A- Parecer do comitê de ética



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 D A
 FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 CAIXA POSTAL 3671
 SÃO PAULO - BRASIL

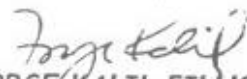
DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 12.12.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 566/01, intitulado: "Estudo da expressão de genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca", apresentado pelo(a) pesquisador(a) DR. MARCOS ROBERTO TAVARES, do Departamento de CIRURGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 12 de Dezembro de 2001.


 PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
 Presidente da Comissão Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

ANEXO C: Análise estatística (Z-Test)

Teste 1: Proporção de amplificação versus proporção de não-amplificação

Para o teste da proporção de ocorrência versus não-ocorrência de amplificação, definimos as seguintes hipóteses:

Hipótese nula: $\text{proporção(amplificação)} = \text{proporção(não amplificação)}$, ou seja,
 $\text{proporção(amplificação)} - \text{proporção(não amplificação)} = 0$

Hipótese alternativa: $\text{proporção(amplificação)} \neq \text{proporção(não amplificação)}$, ou seja,
 $\text{proporção(amplificação)} - \text{proporção(não amplificação)} \neq 0$

Efetuando o teste z para comparação entre proporções, verificamos um *p-value* de 0.00, abaixo de nosso corte de 0.05, de modo que se pode rejeitar a hipótese nula de que ambas as proporções sejam estatisticamente iguais em favor da hipótese alternativa de que as proporções sejam estatisticamente diferentes.

```
. prtest amp= no_amp
```

```
Two-sample test of proportion          amp: Number of obs =      29
                                       no_amp: Number of obs =    29
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
amp	.862069	.0640329			.7365668 .9875711
no_amp	.137931	.0640329			.0124289 .2634332
diff	.7241379	.0905562			.5466511 .9016247
	under Ho:	.1313064	5.51	0.000	

Ho: proportion(amp) - proportion(no_amp) = diff = 0

Ha: diff < 0	Ha: diff != 0	Ha: diff > 0
z = 5.515	z = 5.515	z = 5.515
P < z = 1.0000	P > z = 0.0000	P > z = 0.0000

Teste 2: Proporção de tumor versus proporção de não-tumor quando houve amplificação

Para o teste da proporção de incidência versus não-incidência de tumor quando houve amplificação, definimos as seguintes hipóteses:

Hipótese nula: $\text{proporção}(\text{tumor}) = \text{proporção}(\text{não tumor})$, ou seja,
 $\text{proporção}(\text{tumor}) - \text{proporção}(\text{não tumor}) = 0$

Hipótese alternativa: $\text{proporção}(\text{tumor}) \neq \text{proporção}(\text{não tumor})$, ou seja,
 $\text{proporção}(\text{tumor}) - \text{proporção}(\text{não tumor}) \neq 0$

Efetuada o teste z para comparação entre proporções, verificamos um *p-value* de 0.30, acima de nosso corte de 0.05, de modo que não se pode rejeitar a hipótese nula de que ambas as proporções sejam estatisticamente iguais.

```
. prtest no_tum= tumor if amp==1
```

```
Two-sample test of proportion          no_tum: Number of obs =      25
                                       tumor: Number of obs =      25
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
no_tum	.72	.0897998			.5439957 .8960043
tumor	.84	.0733212			.6962931 .9837069
diff	-.12	.115931			-.3472206 .1072206
	under Ho:	.1171665	-1.02	0.306	

```
Ho: proportion(no_tum) - proportion(tumor) = diff = 0
```

Ha: diff < 0	Ha: diff != 0	Ha: diff > 0
z = -1.024	z = -1.024	z = -1.024
P < z = 0.1529	P > z = 0.3057	P > z = 0.8471

Teste 3: Proporção de apenas tumor versus apenas não-tumor quando houve amplificação

Para o teste da proporção de incidência versus não incidência de apenas-tumor quando houve amplificação, definimos as seguintes hipóteses:

Hipótese nula: $\text{proporção}(\text{apenas tumor}) = \text{proporção}(\text{apenas não-tumor})$, ou seja,
 $\text{proporção}(\text{apenas tumor}) - \text{proporção}(\text{apenas não-tumor}) = 0$

Hipótese alternativa: $\text{proporção}(\text{apenas tumor}) \neq \text{proporção}(\text{apenas não-tumor})$, ou seja,
 $\text{proporção}(\text{apenas tumor}) - \text{proporção}(\text{apenas não-tumor}) \neq 0$

Efetuada o teste z para comparação entre proporções, verificamos um *p-value* de 0.30, acima de nosso corte de 0.05, de modo que não se pode rejeitar a hipótese nula de que ambas as proporções sejam estatisticamente iguais.

```
. prtest so_nt= so_t if amp==1
```

```
Two-sample test of proportion          so_nt: Number of obs =    25
                                       so_t: Number of obs =    25
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
so_nt	.16	.0733212			.0162931 .3037069
so_t	.28	.0897998			.1039957 .4560043
diff	-.12	.115931			-.3472206 .1072206
	under Ho:	.1171665	-1.02	0.306	

Ho: proportion(so_nt) - proportion(so_t) = diff = 0

Ha: diff < 0	Ha: diff != 0	Ha: diff > 0
z = -1.024	z = -1.024	z = -1.024
P < z = 0.1529	P > z = 0.3057	P > z = 0.8471

Teste 4: Proporção apenas tumor versus ambos quando houve amplificação

Para o teste da proporção de incidência de ambos versus a incidência de apenas tumor quando houve amplificação, definimos as seguintes hipóteses:

Hipótese nula: proporção(ambos) = proporção(apenas tumor), ou seja,
 proporção(ambos) – proporção(apenas tumor) = 0

Hipótese alternativa: proporção(ambos) > proporção(apenas tumor), ou seja,
 proporção(ambos) – proporção(apenas tumor) > 0

Efetuando o teste z para comparação entre proporções, verificamos um *p-value* de 0.02, abaixo de nosso corte de 0.05, de modo que se pode rejeitar a hipótese nula de que ambas as proporções sejam estatisticamente iguais para aceitar a hipótese alternativa de que a proporção de incidência de ambos é estatisticamente superior à incidência de apenas tumor.

```
. prtest ambos=so_t if amp==1
```

```
Two-sample test of proportion          ambos: Number of obs =    25
                                       so_t: Number of obs =    25
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
ambos	.56	.0992774			.3654199 .7545801
so_t	.28	.0897998			.1039957 .4560043
diff	.28	.1338656			.0176282 .5423718
	under Ho:	.1395994	2.01	0.045	

Ho: proportion(ambos) - proportion(so_t) = diff = 0

Ha: diff < 0	Ha: diff != 0	Ha: diff > 0
z = 2.006	z = 2.006	z = 2.006
P < z = 0.9776	P > z = 0.0449	P > z = 0.0224

Teste 5: Proporção apenas não-tumor versus ambos quando houve amplificação

Para o teste da proporção de incidência de ambos versus a incidência de apenas não-tumor quando houve amplificação, definimos as seguintes hipóteses:

Hipótese nula: $\text{proporção(ambos)} = \text{proporção(apenas não-tumor)}$, ou seja,
 $\text{proporção(ambos)} - \text{proporção(apenas não-tumor)} = 0$

Hipótese alternativa: $\text{proporção(ambos)} > \text{proporção(apenas não-tumor)}$, ou seja,
 $\text{proporção(ambos)} - \text{proporção(apenas não-tumor)} > 0$

Efetuada o teste z para comparação entre proporções, verificamos um *p-value* de 0.00, abaixo de nosso corte de 0.05, de modo que se pode rejeitar a hipótese nula de que ambas as proporções sejam estatisticamente iguais para aceitar a hipótese alternativa de que a proporção de incidência de ambos é estatisticamente superior à incidência de apenas não-tumor.

```
. prtest ambos= so_nt if amp==1
```

```
Two-sample test of proportion          ambos: Number of obs =      25
                                       so_nt: Number of obs =      25
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
ambos	.56	.0992774			.3654199 .7545801
so_nt	.16	.0733212			.0162931 .3037069
diff	.4	.123418	2.95	0.003	.1581052 .6418948
	under Ho:	.1357645			

```
Ho: proportion(ambos) - proportion(so_nt) = diff = 0
```

Ha: diff < 0	Ha: diff != 0	Ha: diff > 0
z = 2.946	z = 2.946	z = 2.946
P < z = 0.9984	P > z = 0.0032	P > z = 0.0016

Tabela Matriz

A tabela matriz foi construída tornando binárias todas as variáveis de interesse, sendo aquelas em que se verificou a ocorrência do fenômeno estudado codificadas como 1, e aquelas nas quais não se verificou a incidência do fenômeno codificadas como 0, conforme abaixo:

<i>Variável</i>	<i>Caso</i>	<i>Amplificou Amp</i>	<i>Não amplificou No_Amp</i>	<i>Não tumor No_Tum</i>	<i>Tumor Tumor</i>	<i>Só não-tumor So_NT</i>	<i>Só tumor So_T</i>	<i>Ambos Ambos</i>
	12	1	0	1	1	0	0	1
	14	1	0	1	1	0	0	1
	16	1	0	1	1	0	0	1
	17	1	0	1	1	0	0	1
	18	0	1	0	0			
	19	1	0	1	0	1	0	0
	20	1	0	1	1	0	0	1
	21	1	0	0	1	0	1	0
	24	1	0	1	0	1	0	0
	25	0	1	0	0			
	26	1	0	1	1	0	0	1
	27	1	0	0	1	0	1	0
	29	1	0	1	1	0	0	1
	31	1	0	1	1	0	0	1
	32	1	0	0	1	0	1	0
	33	1	0	1	1	0	0	1
	34	1	0	1	1	0	0	1
	35	1	0	0	1	0	1	0
	36	0	1	0	0			
	37	1	0	1	1	0	0	1
	40	1	0	1	1	0	0	1
	41	1	0	0	1	0	1	0
	43	1	0	1	0	1	0	0
	44	0	1	0	0			
	45	1	0	0	1	0	1	0
	46	1	0	1	0	1	0	0
	50	1	0	1	1	0	0	1
	53	1	0	0	1	0	1	0
	54	1	0	1	1	0	0	1